



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

Медицински университет - Варна

„Проф. Д-р Параскев Стоянов”

Факултет „Медицина”

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

Д-р Милена Петрова Стоянова

**Генетико-диагностично проучване при лица в
детска възраст с наследствена патология,
преминали през кабинета за генетично
консултиране**

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”**

Научна специалност „Генетика”

Научен ръководител:

Проф. д-р Людмила Ангелова, дм

Варна, 2022 г.



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

Медицински университет -Варна

„Проф. Д-р Параскев Стоянов”

Факултет „Медицина”

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

Д-р Милена Петрова Стоянова

Генетико-диагностично проучване при лица в детска възраст с наследствена патология, преминали през кабинета за генетично консултиране

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”

Област на висше образование: 4
Професионално направление: 4.3
Научна специалност „Генетика”

Научен ръководител:

Проф. д-р Людмила Ангелова, дм

Научно жури:

Проф. д-р Савина Хаджидекова, д.м.
Проф. Албена Тодорова-Георгиева, д.б.н.
Проф. д-р Катя Ковачева, д.м.
Проф. д-р Виолета Йотова, д.м.н.
Доц. д-р Трифон Червенков, д.б.

Варна, 2022 г.

Дисертационният труд е представен на 149 страници и съдържа 17 таблици, 34 фигури и 1 приложение. Цитирани са 246 литературни източници, от които 25 на кирилица и 221 на латиница. Цитирани са и 15 електронни източника.

Дисертацията е изработена в:

- Катедра по Медицинска генетика, Медицински университет – Варна
- Лаборатория по Медицинска генетика, УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД – Варна

Част от проведените изследвания са финансирани частично по научно-изследователски проект № 18015 „Молекулярно-генетичен анализ при деца с неизяснени редки генетични болести“, финансиран от фонд „Наука“ (конкурсна сесия 2018) към Медицински университет Варна.

Дисертационният труд е представен на заседание на разширен Катедрен съвет на Катедра „Медицинска генетика“, Медицински Университет – Варна, на 13.07.2022 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 27.10.2022г. в Катедра „Медицинска генетика“, МУ Варна, УМБАЛ „Св.Марина“ бул. „Хр. Смирненски“ 1, Варна.

Материалите по защитата са на разположение в Отдел „Докторантско училище“, МУ Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

1. ВЪВЕДЕНИЕ	5
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
2.1. Цел.....	7
2.2. Задачи.....	7
3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	8
3.1. Материал.....	8
3.1.1. Клиничен материал (изследвани пациенти).....	8
3.1.2. Биологичен материал (проби).....	9
3.2. Методи.....	9
3.2.1. Клинични методи.....	9
3.2.2. Лабораторни методи.....	11
3.2.3. Дисморфологични бази данни и софтуерни онлайн-базирани програми.....	13
3.2.4. Методи за статистическа обработка на данните.....	13
4. РЕЗУЛТАТИ	14
4.1. Дескриптивно – епидемиологична характеристика на пациентите включени в проучването.....	14
4.1.1. Брой на преминалите пациенти по години.....	14
4.1.2. Възрастово-полова характеристика.....	15
4.1.3. Източници за насочване.....	15
4.1.4. По видове показания.....	16
4.1.5. Характеристика на селектирана група пациенти подложена на активна диагностична (лабораторна и консултативна) дейност.....	18
4.2. Представяне и анализ на резултатите от лабораторните изследвания по вид анализ и генетични диагнози от МГК на обхванатия контингент пациенти в детска възраст.....	20
4.2.1. Конвенционален цитогенетичен анализ (ЦГА) на лимфоцитни култури.....	20
4.2.2. ДНК анализ за селективен скрининг на моногенни заболявания, наследствени предразположения към заболявания, фармакогенетични дефекти.....	24
4.2.3. Резултати от <i>активна</i> диагностична (лабораторна и консултативна) дейност при <i>селектирана</i> група пациенти с генетично неуточнено / недоказано заболяване.....	27
4.2.4. Обобщение на резултатите.....	38
5. ОБСЪЖДАНЕ	42
5.1. Обсъждане на резултати от <i>дескриптивно-епидемиологичната</i> характеристика на проучвания контингент.....	42
5.2. Обсъждане на резултати от проведени генетични и метаболитни изследвания.....	46
5.2.1. Конвенционален цитогенетичен анализ.....	46
5.2.2. Резултати от ДНК анализ за моногенни заболявания, наследствени предразположения към заболявания, фармакогенетични дефекти.....	48
5.2.3. Обсъждане на резултати от активна диагностична дейност (лабораторна и консултативна) при селектирана група пациенти с генетично неуточнено заболяване.....	50
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И НАСОКИ ЗА БЪДЕЩА РАБОТА	57
7. ИЗВОДИ	60
8. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	63
9. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА	64

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

РБ - редки болести

МГК - медико-генетична консултация

ХБ- хромозомни болести

ВА – вродена аномалия

МВА - множествени вродени аномалии

УмИ - умствено изоставане

АД - автозомно-доминантни

АР - автозомно-рецесивни

ВГО – вродени грешки на обмяната

НПР - невро-психическо развитие

ГК - генетично консултиране

ХА – хромозомни аномалии

ЦГА – цитогенетичен анализ

ЛМГВ – Лаборатория по медицинска генетика - Варна

НГЛ – Национална генетична лаборатория

I ДК - Първа детска клиника

II ДК - Втора детска клиника

ДОИЛ - Детско отделение за интензивно лечение

КДКХО - Клиника по детска клинична хематология и онкология

ДЮП - Клиника по детско- юношеска психиатрия

FISH - флуоресцентна ин ситу хибридизация

CNV - промени в броя копия

PCR - полимеразно - верижна реакция

array-CGH – array-comparative genome hybridization

MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification

NGS - Next-Generation Sequencing

CES - клинично екзомно секвениране

WES- цялоекзомно секвениране

WGS - цялогеномно секвениране

VUS – варианти с неясно значение

FRAXA - синдром на чуплива X-хромозома

ASD – нарушения от аутистичния спектър

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Генетичните (наследствени) болести и вродените аномалии засягат около 6% от живородените и са сред водещите причини за заболяемост и смъртност в детска възраст (*Farnaes et al., 2018*). Проучвания показват, че около 20-35% от смъртните случаи на новородени и деца до 5 години се дължат на генетично детерминирани нарушения (*Stevenson et al., 2005; Kochanek et al., 2012*). За тези, които преживеят, тези заболявания могат да са причина за умствено, физическо, слухово или зрително увреждане за цял живот.

Наследствените заболявания и вродените аномалии са свързани със сериозни неблагоприятни ефекти както за децата, така и за техните семейства, здравните системи и обществото. По-голямата част от генетичните болести имат ниска индивидуална честота, поради което се причисляват към групата на т.нар. *редки болести (РБ)*, засягащи между 6 и 8% от хората през живота им (*Zurynski et al., 2017*). Около 70-80% от РБ имат генетична етиология и голяма част от тях (50-75%) са с начало в детска възраст (*Nguengang Wakap, 2020; Bick et al., 2019*).

Диагностицирането на пациент с *рядко* генетично заболяване е трудна задача, поради факта, че РБ се характеризират с голямо разнообразие от симптоми и нарушения, които силно варират от една нозологична единица до друга. Лекарят, без значение на специалността си много често не среща аналогичен случай в своята практика, а понякога случаят остава единствен. Най-често диагнозата се поставя със значително закъснение. Дори когато диагнозата е поставена навреме обаче, пациентите и техните семейства изпитват огромни затруднения да получат по-подробна информация за самото заболяване – риск за потомството, прогноза, референтна генетична лаборатория у нас и по света за потвърждаването му, възможности за лечение и дородова диагностика. Именно тук важна роля играе медицинският генетик в достигането до точна етиологична диагноза, който със своя опит и познание в много случаи съкращава значително диагностичното търсене. Това е ключов елемент, както за прогнозата и лечението на засегнатите, така и за генетичното консултиране на семейството по отношение репродуктивно планиране и пренатална диагностика. В повечето случаи предотвратяването на появата на нови болни е единствена възможност за превенция на генетичните заболявания. Независимо от значителния напредък в областта на генната терапия, все още е изключително малък броя на успешно лечимите генетични заболявания.

В последните години се наблюдава бурно развитие на технологиите за геномен анализ, както и рязко увеличаване на научните открития, свързани с патогенезата на заболяванията на молекулно ниво. Медицинските иновации все повече ще се фокусират върху предоставянето на грижи, съобразени с индивидуалните модели на генетично предразположение. Все повече

клиницисти ще се нуждаят от точната генетична причина за дадено заболяване, с цел най-ефективен и специфичен превантивен и терапевтичен подход за облекчаване на симптомите или предотвратяване на усложненията.

Настоящият дисертационен труд насочва вниманието към актуален здравен проблем – генетичните заболявания и вродени аномалии при педиатрични пациенти. Акцентира се на необходимостта от генетично консултиране при тези лица и се обсъждат възможностите и ограниченията на прилаганите понастоящем генетични изследвания. Настоящият труд обобщава опита на Лабораторията по медицинска генетика в УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна в генетичното консултиране и изследвания на пациенти в детска възраст със съмнение за наследствена патология за период от десет години.

Хипотеза Липсата на достатъчно проучвания за ефекта от работата на медико-генетичните консултативни центрове с педиатрични пациенти в нашата страна, за диагностичните възможности и все по-голямото търсене на генетични услуги беше предпоставка за разработване на настоящия дисертационен труд.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. Цел

Дескриптивно-епидемиологична оценка и проучване ефекта от дейността на генетичната консултация като подход за клинично – генетичната диагностика при лица със съмнение за наследствена патология в детска възраст на базата на опита на Университетски генетичен център за период от десет години.

2.2. Задачи

1. Да се *отдиференцира* контингента пациенти на възраст 0-18 години, регистриран в кабинета за медико-генетично консултиране за период от 10 години, да се *селектират* пациенти с неизяснено/недоказано нарушение, подлежащо на активна диагностична дейност и *охарактеризира* (дескриптивно-епидемиологично и класификационно по показания за насочване).
2. Да се обобщят и анализират резултатите от проведените лабораторно-генетични изследвания (във и извън секторите на Университетската болнична структура) за оценка диагностичния *лабораторен принос* в изясняване етиологията на наследствените нарушения при деца.
3. Да се направи оценка от *цялостна дейност* на МГК като основна структура за генетична помощ в ЛМГВ, в мултидисциплинарния диагностичен процес по разкриване генетичната етиология на болести и предразположения при пациенти в детска възраст.
4. Да се анализира ролята на *активната генетична диагностична (лабораторна и консултативна)* дейност на МГК при селектирана група пациенти с *неизяснено/недоказано нарушение* за оценка участието и принос на генетичното звено.
5. Да се изградят *насоки за подобряване подхода* за провеждане на клинично - генетична оценка на наследствено заболяване при деца като етап от цялостната мултидисциплинарна грижа към пациента в клинично-лабораторната практика.

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. Материал

3.1.1. Клиничен материал (изследвани пациенти)

Настоящото проучване касае лица на възраст под 18 години, със съмнение за генетична или вродена патология. То обхваща период от десет години, от месец януари 2011г. до месец декември 2020г. и е проведено в Медицински Университет-Варна и Лаборатория по медицинска генетика - Варна (ЛМГВ).

За посочения период са регистрирани в МГК за консултация и/или генетичен анализ общо **3 124** педиатрични пациенти, на възраст от 0 до 18 години (средна възраст 5.9 години). От тях 1855 (59.4%) са от мъжки пол, а останалите 1269 (40.6%) – от женски пол (М:Ж =1.5:1).

Проучваните пациенти/техни биологични проби са преминали през ЛМГВ по време на хоспитализацията им в клиники при УМБАЛ „Св.Марина“ ЕАД – Варна, други болнични заведения във или извън града или амбулаторно. *Хоспитализираните* в УМБАЛ „Св.Марина“ пациенти са насочвани от лекуващи лекари от:

- Първа детска клиника (I ДК) с Детско отделение за интензивно лечение (ДОИЛ)
- Втора детска клиника (II ДК)
- Клиника по детска клинична хематология и онкология (КДКХО)
- Клиника по детско- юношеска психиатрия (ДЮП)

Амбулаторно лицата са насочвани от:

- личен лекар
- клиницисти и специалисти от външни структури за болнична (предимно неонатологични звена) и доболнична помощ
- по собствена инициатива на родителите

Преобладава броят на пациентите, жители на област Варна, но са изработвани проби/и или са консултирани пациенти и от други области, предимно от региона на Североизточна България.

С цел да се представи активната дейност на генетичния консултант при работа с педиатрични пациенти и да се разграничи от предимно лабораторната, от общия брой регистрирани (3124) се селектира група от 968 лица (31,0%). При тях се приложи активен диагностичен подход на МГК (лабораторен и консултативен) за поставяне на клинична и/или генетична диагноза на подозирано или неизяснено нарушение с участието на специалист по медицинска генетика.

3.1.2. Биологичен материал (проби)

- *проби, изработвани в ЛМГВ*

Пробите за цитогенетичен анализ от лимфоцитни култури и за молекулярно-генетичен анализ от периферна кръв (PCR, RT-PCR, fra X screening, MLPA) са изпълнявани съобразно лабораторните протоколи.

- *проби изработвани в лаборатории извън ЛМГВ*

Биохимичните, ензимните и голяма част от молекулярно-генетичните методи са провеждани:в

- Национална генетична лаборатория (НГЛ, Лаборатория по клинична генетика), СБАЛАГ “Майчин дом“ – София
- Генетична медико-диагностична лаборатория (ГМДЛ) „Геника“ – София
- Катедра по Медицинска генетика – София
- Лаборатория по геномна диагностика – София
- Генетични лаборатории в чужбина

Биологичен материал (24 часова урина, цяла кръв, кръв върху филтърна бланка) е събиран от лечебно-диагностичните структури на УМБАЛ „Св. Марина“ Варна, други болнични заведения, в домашна среда за амбулаторни пациенти и/или в ЛМГВ. Биологичен материал (цяла кръв или изолирана ДНК), изпращани към научни и диагностични лаборатории във и извън страната, е съхраняван и транспортиран съобразно условията за съответната проба, като логистичната и регистрационна функция е извършвана от докторанта и неговите сътрудници.

3.2. Методи

В списъка с приложени методи са разгледани и описани единствено тези, изпълнени от докторанта и/или сътрудници по дейността в ЛМГВ. При използване на данните от проведени генетични анализи, част от рутинната дейност на лабораторията, родителите на децата подписват информирано съгласие за използване на информацията при спазване на конфиденциалност. Провеждането на нови за ЛМГВ генетични анализи при селектирана група от пациенти беше финансирано след спечелване на научен проект (№18015) към фонд „Наука“ на МУ-Варна. Проспективното проучване беше разрешено от Комисията по етика на научните изследвания към Медицински Университет – Варна с протокол № 83/16.05.2019г.

3.2.1 Клинични методи

Документален метод

Подходът за набиране на максимално пълна информация за клиничните и параклинични данни при пациентите, както и проследяване развитието на диагностичния процес включва събиране на данни чрез:

- *обработка на данни* на база наличната болнична софтуерна програма (Gamma MultiLab), наличните лабораторни журналы и лични файлове на консултирани пациенти, съхранявани в ЛМГВ
- *епикризи и резултати от лабораторен анализ* на лица, родени в обсега на обслужваните от ЛМГВ неонатологични и педиатрични звена, изследвани за хромозомна болест, метаболитно или друго моногенно заболяване или предразположение
- *индивидуален контакт за обратна връзка* (по телефон, имейл, на място).

Генеалогичен метод и фамилна анамнеза

Дейността е свързана с недирективно и неимперативно общуване за снемане на фамилна анамнеза и родословна схема на всички деца, насочени за генетична консултация като целта е да се проведе генеалогичен анализ на обхванати родственици от поне три поколения.

Провеждана е лична среща (от докторанта или сътрудници лекари-консултанти в кабинета) с родители/други родственици/настойници. Събирана е подробна информация относно:

- фамилна обремененост с наследствени заболявания/вродени аномалии
- репродуктивна патология
- история на бременността и раждането
- неонатален статус
- история на развитието - общо здравословно състояние, растеж и прогрес в развитието, поведение, придружаващи заболявания, провеждани изследвания до момента, лечение

Физикално изследване

Извършвано е стандартно клинично изследване или е използвана информация от данните на насочващия специалист, включващо:

- общ клиничен статус
- антропометрични показатели (ръст, тегло, растежна скорост, обиколка на главата)
- пубертетно развитие
- търсене и описание на лицеви и телесни дисморфични белези
- фото и/или видео заснемане на децата с дисморфизъм след подписано информирано съгласие от родител/настойник и съхраняване на материалите в база данни, защитени с код за достъп.
- оценка на НПР/ умствено развитие/ поведенчески отклонения от педиатър/детски невролог/психолог/психиатър

3.2.2. Лабораторни методи

За целите на поставените задачи в годините са разработвани и рационално използвани разнообразни методи за генетични изследвания, както на местно, така и на национално ниво. При технологична невъзможност за извършване на необходимата лабораторна диагностика в ЛМГВ, съответният биологичен материал или пациент е бил насочван към акредитирана релевантна лаборатория в България или в чужбина.

Проведени в ЛМГВ:

Цитогенетичен метод

Цитогенетичният анализ (ЦГА) върху биологичен материал от периферна кръв се извършва по установен протокол и в съгласие с Мед ицински стандарт „Медицинска генетика“. ЦГА се провежда по протокол върху 10-12 метафазни пластини, диференциално оцветени с GTG-техника при резолюция 400-550 бенда. При съмнение за мозаицизъм, броят на анализирани пластинки се увеличава до 100. Рутинно използваната методика за цитогенетичен анализ не дава възможност за диагностициране на малки хромозомни преустройства (резолюция до 5-10Mb) и нискостепенен мозаицизъм.

Молекулярно- генетични (ДНК) методи

- **Изолиране на ДНК (преданалитична фаза)**

Изолиране на високомолекулярна ДНК от венозна кръв по *солевия метод или чрез кит* базиран на взаимодействието между силика-гел мембрана и ДНК, следвайки инструкциите на производителя (QIAmp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany или GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit, ThermoFisher). Количеството и качеството на добитата по двата метода ДНК се измерват с NanoDrop 2000c (ThermoScientific), като таргетни стойности за чистота се приемат 260/280 ~ 1.8; 260/230 ~ 2.0.

- **dTP-PCR (direct triplet-primed PCR) и melting curve анализ (скрининг за синдром на чуплива X-хромозома, FRAXA)**

За идентифициране на намножен CGG повтор е използван идентификационен кит (The FastFrx FMR1 Screening Kit, Biofactory Pre Ltd), предназначен за разграничаване на проби с пре- и пълна мутация от нормалните алели FMR1 (≥ 55 rpts). Анализът на dTP-PCR се извършва в съответствие с инструкциите на производителя. Две гранични контролни ДНК проби с 41 и 53 повторения CGG (NA20244, NA20230) (Coriell Cell Repositories) са използвани за установяване на cut off температури. Пробите, които показват повишен CGG повтор допълнително са потвърдени от FastFrx FMR1 Sizing Kit (The Biofactory Pre Ltd).

- **Мултиплексна лигазно-зависима реакция на амплификация на пробата (MLPA)**

Проби са подложени на MLPA анализ, извършен съгласно препоръките на производителя (SALSA MLPA Probemix P245 Microdeletion Syndromes-1A и P036 Subtelomers Mix 2B, MRC Holland). Кит P245-1A съдържа 50 специфични сонди за гени, асоциирани с 33 заболявания, кит P036 2B – 41. Електрофорезата се извършва с помощта на генетичен анализатор GeXP Beckman Coulter със стандарт за размер 600 (Sciex). Данните са експортирани и анализирани със специализиран софтуер Coffalyser. За нормализиране на данните са включени 10 референтни ДНК последователности.

- **Real-Time PCR**

Предразположение към целиакия - методът на изследване е Real-Time PCR на апарат QuantStudio Dx, ThermoFisher с търговски китове Genvinset HLA Celiac, IVD и CE маркирани. Изследваните алелни групи са три - *DQB1*02*, *DQA1*05*, *DQB1*03:02*. С използвания метод е възможно определянето на 9 генотипа. Всеки генотип оценява степента на генетична предразположеност на базата на 5-степенна скала и величината на риска.

Наследствено предразположение към тромбообразуване (тромбофилия)- използвайки полимеразо-верижна реакция в реално време (RT - PCR) на апарат (QuantStudio Dx, Applied Biosystems, САЩ) ДНК проби са генотипизирани за полиморфизми FV Leiden (G1691A), F II (G20210A), PAI 4G / 5G и MTHFR (C677T), съгласно протокола на производителя (Geneti Biotech) IVD и CE маркирани.

Синдром на Gilbert -за идентифициране на двата най-често срещани генотипа - хомозиготния полиморфизъм на две допълнителни бази (ТА) в ТАТАА последователността на промоторния регион на *UGT1A1* гена са използвани търговски китове Gb GENETIC Gilbert, IVD и CE маркирани, апарат QuantStudio Dx, ThermoFisher. Допълнителните бази намаляват афинитета на ТАТАА участъка към свързващия протеин, водейки до намалена генна експресия. Изследвани са алели *UGT1A1*1/ *28*, отговарящи на съответно (ТА)6 / (ТА)7 брой повтори в *UGT1A* гена. Изследването включва само най-честите генетични варианти, водещи до наследствена неконюгирана хипербилирубинемия - синдром на Gilbert.

Проведени извън ЛМГВ

Селективен метаболитен скрининг/ензимен анализ; микрочипов анализ; секвениране по Sanger, новогенерационно секвениране, Methylation-specific MLPA, Methylation-specific PCR; както и част от MLPA анализите, молекулярно-генетичен скрининг за FRAXA, за наследствени предразположения (целиакия, тромбофилия, синдром на Gilbert) в началните години на проучвания период.

3.2.3. Дисморфологични бази данни и софтуерни онлайн-базирани програми

Поради ниската честота и многообразието от дисморфични синдроми и генетични състояния, в процеса на изясняване диагнозата на консултираните педиатрични пациенти, често се използват *фенотип-базирани софтуерни и компютърни дисморфологични програми*. Посочени са някои от използваните в практиката на докторанта и сътрудници източници.

- *OMIM* (Online Mendelian Inheritance in Man), (John Hopkins University) (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)
- London Medical Databases/ Winter-Baraister Dysmorphology Database (<https://www.face2gene.com/lmd-library-london-medical-database-dysmorphology/>)
- *FACE2GENE* (<https://www.face2gene.com/>) - фенотипизиране от ново поколение с лицево разпознаване и анализ на допълнителни клинични белези. Осигурява достъп до London Medical Databases. Използването на тази програма започна след 2015г.
- ORPHA.NET (<https://www.orpha.net/>) - с достоверна информация за редки заболявания, лекарства – сираци, експертни центрове и мрежи, лаборатории и диагностични тестове;
- Monarch Initiative (<https://monarchinitiative.org/analyze/phenotypes>)

3.2.4. Методи за статистическа обработка на данните

За статистически анализ и представяне на резултатите са използвани следните статистически методи и софтуерни програми:

1. *Непараметрични* анализи- метод хи-квадрат (Chi-square test) или точен тест на Фишер (Fisher's exact test)
2. *Регресионен* анализ – използван е трендови модел за прогнозиране на бъдещи стойности на един временен ред.
3. *Графичен* анализ – за онагледяване и илюстриране на определени закономерности или зависимости чрез различни по вид диаграми. Microsoft Excel 2016 - софтуерна програма за обработка на цифрови данни.
4. *Graph Pad Prism 9* - софтуерна програма, използвана за статистическа обработка на данни.

4. РЕЗУЛТАТИ

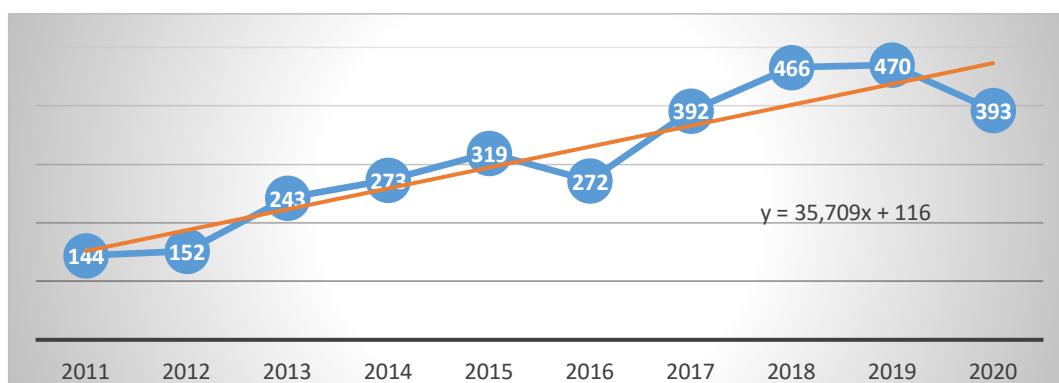
Проведен е ретроспективен анализ за *дескриптивно-епидемиологична оценка* (брой пациенти, разпределение по години, възраст, пол, показание за насочване) и *диагностично – изследователски подход* (индикация - разкрита патология) на детски контингент лица, регистрирани в Кабинета за генетично консултиране.

За 10-годишен период са систематизирани резултатите от а) генетични анализи, приложени за потвърждаване на насочваща клинична диагноза и б) панел от лабораторни изследвания (изработени във или извън ЛМГВ) за етиологично разкриване на наследствени болести и предразположения. Изчислена е диагностичната успеваемост от проведените генетични анализи при пациентите в детска възраст, насочени за конкретно състояние или с подлежащо неуточнено/неясно генетично състояние и е представена разкритата патология по нозологични единици.

4.1. Дескриптивно – епидемиологична характеристика на пациентите включени в проучването

4.1.1. Брой на преминалите пациенти по години

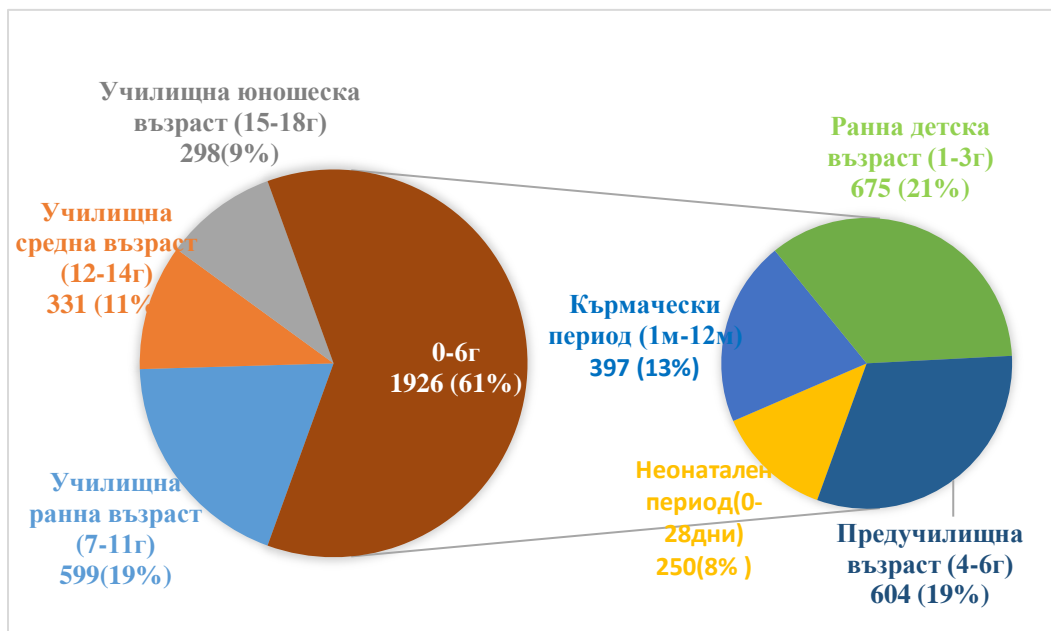
За проучвания период (2011-2020) са проведени медико-генетични консултации и/или генетични изследвания в Лаборатория по медицинска генетика – Варна на **3124** пациенти в детска възраст от общо **6745** (46,3%) регистрирани за периода лица. В общия брой (6745) не са включени лица регистрирани в кабинета по повод генетична профилактика при бременност (общо 29 527 жени) и пациенти (включително деца) с *цитогенетични изследвания на костно-мозъчни култури* (общо 2 459 анализа). Разпределението по години на броя деца, преминали МГК и/или генетичен анализ показва тенденция към съществено увеличаване (Фиг.1).



Фигура 1. Трендови модел на педиатрични пациенти, преминали МГК и/или генетичен анализ за анализирания период

4.1.2. Възрастово-полова характеристика

Възрастта на обхванатите от проучването лица е от 0 до 18 години (средна възраст 5,9 години). Процентното разпределение по **възраст** на анализирания контингент пациенти показва преобладаване на тези между 0 и 6 години - 60,6% (n=1926) (Фиг.2).

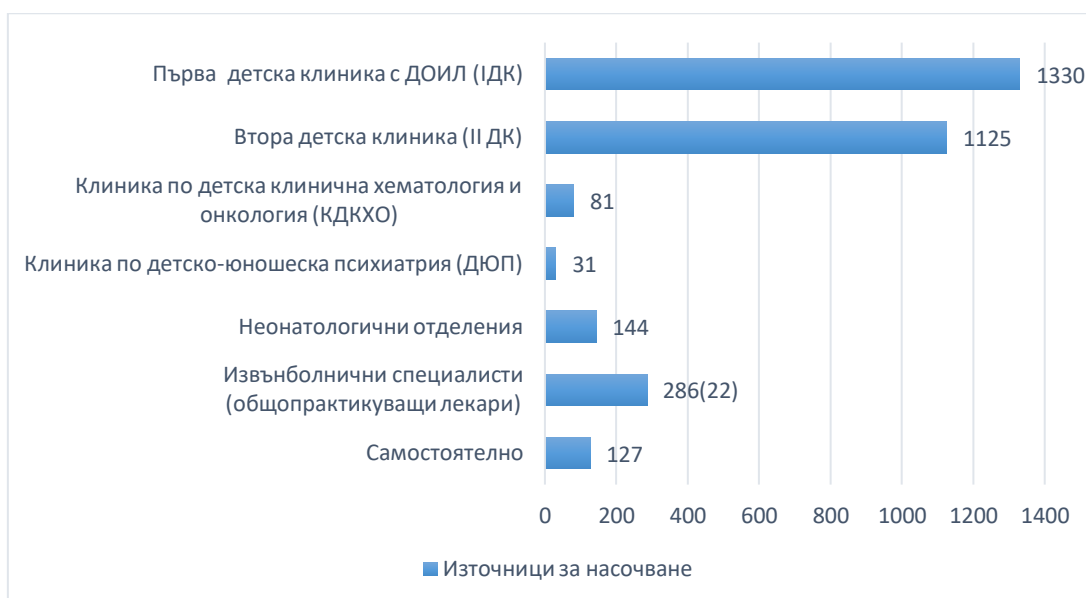


Фигура 2. Процентно разпределение по възраст

Разпределението по пол показва, че 1855 (59,4%) от лицата са от мъжки пол, а останалите 1269 (40,6%) – от женски пол (М:Ж =1,5:1).

4.1.3. Източници за насочване

По-голямата част от пациентите (**82,1%**) са насочвани към МГК и/или за генетичен анализ от педиатрични структури на Университетската болница, с водещо място Първа детска клиника (ендокринология и болести на обмяната, нефрология и кардиология) с общо 1330 (42,6%) насочени (в т.ч. 118 от Детско интензивно отделение), следвана от Втора детска клиника (гастроентерология, неврология и пулмология) - общо 1125 (36%), Клиниката по детска клинична хематология и онкология (2,6%) и Клиника по детско-юношеска психиатрия (1%) (Фиг. 3). Извънболнични пациенти са насочвани от неонатологични отделения във Варна и други градове и от извънболнични специалисти (предимно педиатри), както и самостоятелно потърсили генетична консултация по инициатива на близките.



Фигура 3. Разпределение по насочващи звена

4.1.4. По видове показания

Според клиничното показание за насочване за МГК и/или генетичен анализ изследваният контингент пациенти **условно** може да бъде разпределен в **6** основни групи лица:

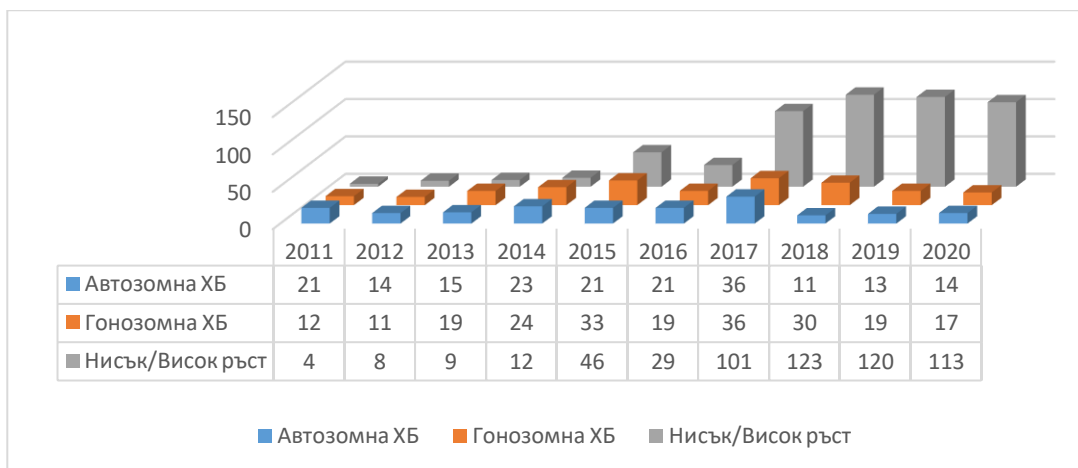
- **Група I** – с вероятна хромозомна болест - **971 (31,1%)**
- **Група II** - с вероятна моногенна (неметаболитна) болест – **517 (16,5%)**
- **Група III** - с вероятно наследствено метаболитно заболяване (ВГО) – **148 (4,7%)**
- **Група IV** - с водещ клиничен фенотип на единични или множествени вродени аномалии / неясен дисморфичен синдром, със или без умствено изоставане (УМИ) – **745 (23,8%)**
- **Група V** - с водещ клиничен фенотип на нарушение в НПП (забавяне, УМИ, поведенчески прояви – нарушения от аутистичния спектър (ASD)) – **473 (15,1%)**
- **Група VI** - Други (изследвани за наследствени предразположения, в т.ч. фармакогенетични дефекти) – **270 (8,6%)**.

По степен на клинична вероятност, групи **I, II и IV** могат да бъдат представени в подраздели.

Група I се подразделя на 3 подгрупи:

- а) вероятна *автозомна* хромозомна болест - **189 деца** (6,0%).
- б) вероятна *гонозомна* хромозомна болест, нарушения на половото развитие - **217** (6,9%)
- с) отклонения в растежа (нисък/висок ръст) – **565 деца** (18,1%), без съпътстващи симптоми / аномалии.

Най-голям е броят на пациентите в група I, като се увеличава значително за сметка на броя на лицата с показание *нисък/висок ръст* (Фиг.4) в периода след 2014 година.



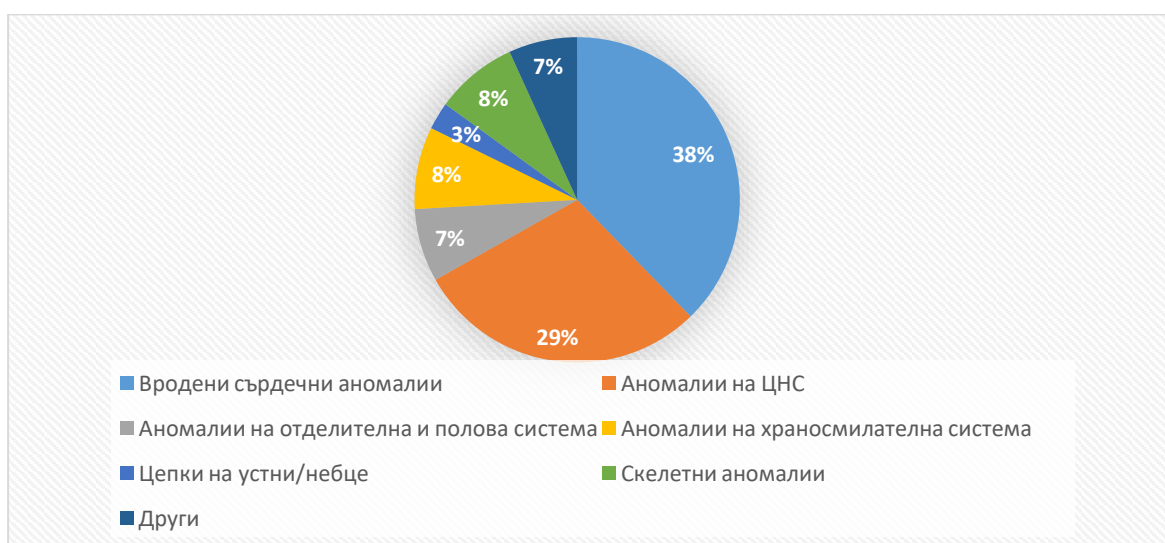
Фигура 4. Разпределение на пациентите от група I по години

В група II - Вероятна моногенна болест – обособят се три подгрупи деца:

- с клинична диагноза на известни и относително по-често срещани *моногенни състояния* (муковисцидоза и бета – таласемия) - 201(6,4%)
- с водеща неврологична / невромускулна симптоматика и съмнение за моногенна болест (вкл. митохондриална болест) – 94 (3,0%)
- със съмнение за друга моногенна болест / синдром (синдром на Марфан, синдром на Нунан, Osteогенезис имперфекта, Ахондроплазия, Бъбречна поликистоза и др.) , в т.ч. *наследствен раков синдром* – 222 (7,1%)

Група IV - показание единични/множествени ВА/неясен дисморфичен синдром три подгрупи:

- Деца с единични вродени аномалии – 220 (7,0%) (Фиг. 5)
- Деца с МВА/неясен дисморфичен синдром със или без УМИ – 453(14,5%)
- Деца със съмнение за заболяване, свързано с нарушен импринтинг – 72 (2,3%)



Фигура 5. Разпределение на видовете единични вродени аномалии сред пациенти от група IV

В група V пациентите са преобладаващо момчета, като процентът им е статистически значимо по-висок ($p < 0,00001$) от този на момичетата в тази група, сравнено със съотношението по пол на всички насочени пациенти за анализирания период. По-голямата част от лицата от група V са насочвани за цитогенетичен анализ и/или молекулярно-генетичен скрининг/ диагностика за синдром на чуплива X хромозома.

4.1.5. Характеристика на селектирана група пациенти подложена на активна диагностична (лабораторна и консултативна) дейност

От общия брой включени в проучването пациенти в детска възраст (3124) се селектира група от 968 лица (31,0%), при които се приложи активен диагностичен подход (лабораторен и консултативен) за поставяне на клинична и/или генетична диагноза на суспектно или неизяснено нарушение с участието на специалист по медицинска генетика.

Селектираната група пациенти, подлежащи на активна диагностична дейност се подразделя според водещ фенотип на показанието за насочване на лица с:

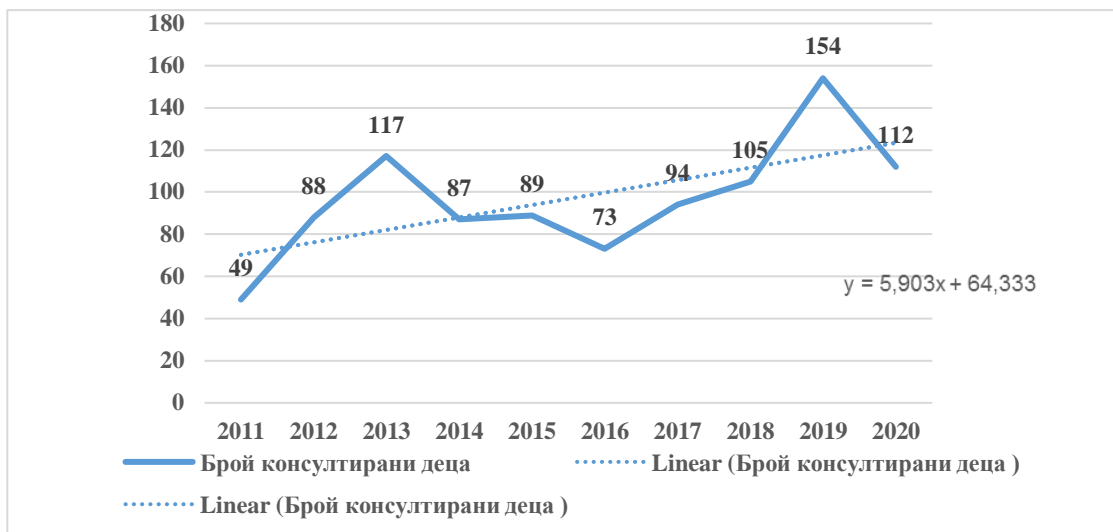
- А - нарушение на растежа и/или половото развитие – 55 (5,7%)
- В - съмнение за моногенна (неметаболитна) болест/синдром в т.ч. наследствен раков синдром - 186 (19,2%)
- С - вероятно наследствено метаболично заболяване – 105 (10,8%)
- D - единични или множествени ВА / неясен дисморфичен синдром, със или без УМИ – 469 (48,5%)
- Е - нарушение в НПР – 153 (15,8%)

В така обособената група пациенти не са включени: а) лица със съмнение за **разпознаваем** хромозомен синдром (напр. тризомия 21 и др.) б) лица със съмнение за **известна** моногенна болест (муковисцидоза, болест на Уилсън, бета-таласемия) в) лица със съмнение за наследствено предразположение (синдром на Gilbert, целиакия, тромбофилия, глюкозо-6-фосфат дехидрогеназен фармакогенетичен дефект и др) г) насочен биологичен материал без лично участие на генетичен консултант, въпреки, че са регистрирани в кабинета за Медико-генетична консултация, като пациенти, подлежащи на генетичен анализ за валидиране на клинична диагноза на насочващото звено.

Селектираната група пациенти (968) включва 572 момчета и 386 момичета (съотношение 1.5:1), като преобладават лицата във възрастта 0-6г (68,3%).

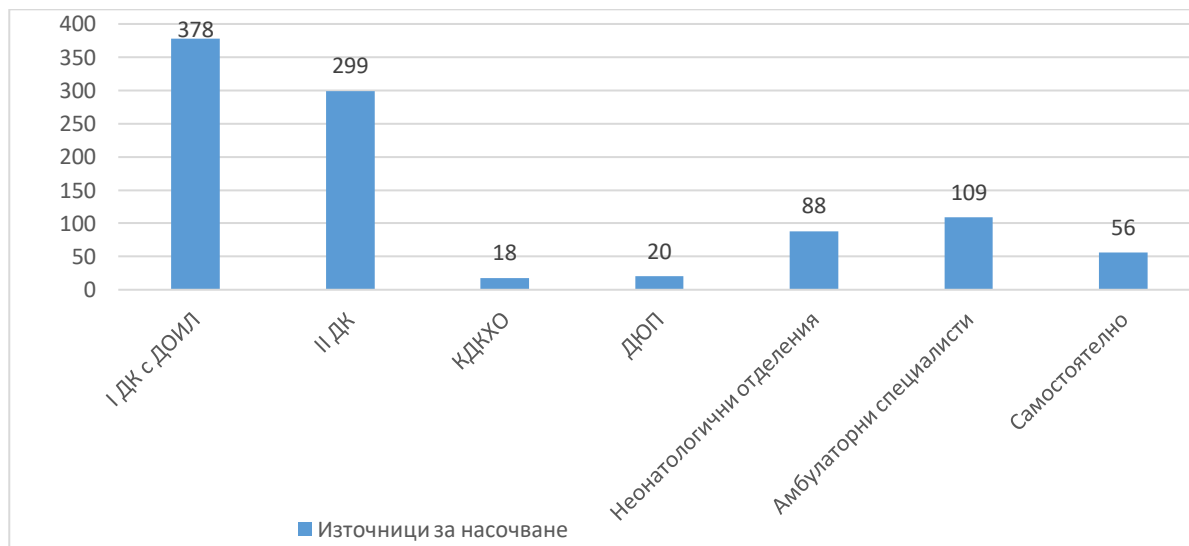
При сравняване на съотношението между броя пациенти в първите и последните две години от отчетния период за общия контингент (1:2,9) и селектирана (1:1,8) група пациенти, приложението на непараметричния тест Хи квадрат не показва статистически значима разлика ($p=0,212$). Наблюдава се, обаче статистически значима разлика с нарастваща динамика на

селектираната група пациенти, въпреки наблюдавания общ спад през последната 2020 г. (фиг.6). Ако се следва трендовия модел за отчетния десетгодишен период може да се предскаже, че след 2 години броят деца, нуждаещи се от **активната** генетично-консултативна помощ ще бъде 135, а след 5 години - 152, т.е тенденцията е към плавно покачване.



Фигура 6. Трендови модел на преминали МГК деца от селектираната група по години

Водещо място в насочването на **селектирания** контингент пациенти за активна диагностична дейност (лабораторна и консултативна) са Детските клинични звена на болницата – 73,8% от насочените, с известен превес на Първа ДК с ДООИЛ (Фиг. 7).



Фигура 7. Разпределение по източници за насочване

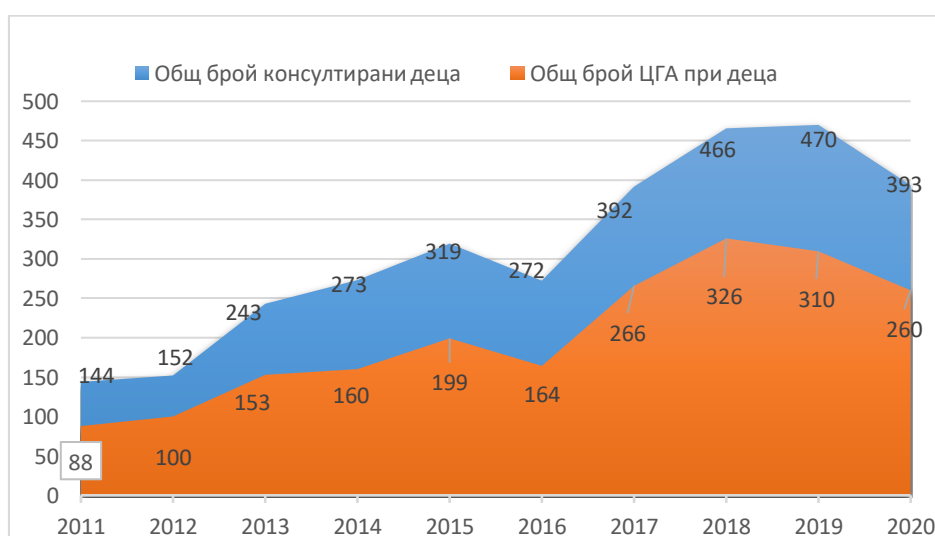
4.2. Представяне и анализ на резултатите от лабораторните изследвания по вид анализ и генетични диагнози от МГК на обхванатия контингент пациенти в детска възраст

За проучвания 10-годишен период в МГК са регистрирани общо **3124** пациенти в детска възраст, по-голямата част с ясна клинична насоченост за определено заболяване или предразположение (цитогенетично, моногенно) и необходимост от лабораторно обслужване/ консултиране за интерпретация на резултата или фамилност. В останалите случаи (968 лица) пациентите са регистрирани в МГК поради необходимост от *активна* диагностична дейност (лабораторна и консултативна) по повод неясно / неуточно заболяване, поради което резултатите от тях са обобщавани и анализирани като отделна категория.

Според показанията за насочване и диагностичните възможности на болшинството пациенти са провеждани различни по вид генетични / метаболитни изследвания като в редица случаи, основно с неясна клинична диагноза, са подлежали на повече от един вид анализ.

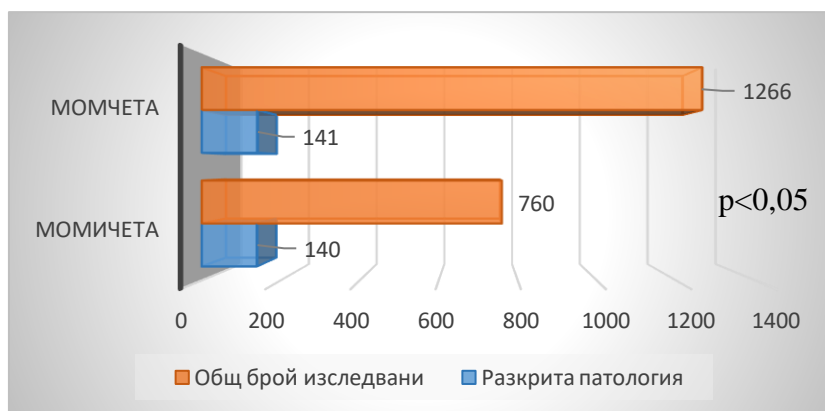
4.2.1. Конвенционален цитогенетичен анализ (ЦГА) на лимфоцитни култури

За визириания период е проведен ЦГА върху лимфоцитни култури на **2026** пациенти, което съставлява **най-високият дял (64,9%)** от целия обхванат за периода детски контингент, регистриран в Лаборатория по медицинска генетика - Варна. Тук са включени и 667 пациенти (32,9%) подлежали на активна диагностична генетично-консултативна дейност. Броят на проведените ЦГА нараства с годините, успоредно с нарастване на броя на регистрирания детски контингент (фиг.8). Цитогенетични нарушения са установени при общо 281 (13,9%) от всички 2026 изследвани пациенти за 10 години.



Фигура 8. Разпределение на пациентите по години: общ брой преминали и изследвани с ЦГА

Разпределението на разкритата хромозомна патология по *пол* показва равен брой, но дялът на разкритите нарушения при изследваните момчета (18,4%) е статистически значимо по-висок от този при изследваните момчета (11,1%) ($\chi^2=15,716$; $p<0,05$), поради преобладаващ брой момчета от група V (изоставане в НПП/УМИ и/или ASD) (Фиг.9).



Фигура 9. Разпределение по пол на броя лица с разкрита цитогенетична патология

Разпределението по показание за насочване за ЦГА и разкрита патология по групи е представено в таблица1. Пациентите са основно от I, IV и V група.

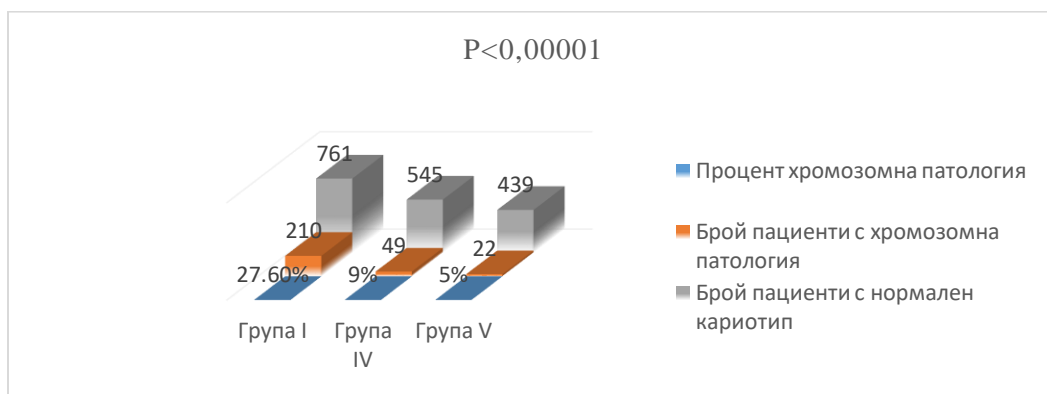
Таблица1.Разпределение на пациентите, провели ЦГА по показание и % разкрита патология

Показание	Брой изследвани лица (%)	Брой разкрита патология (%)	Дял (в%) от разкритата патология
Група I (971 пациенти)			
а) вероятна <i>автосомна</i> ХБ	189 (9,3%)	157 (83,1%)	55,9%
б) вероятна <i>гонозомна</i> ХБ, друго нарушение в половото развитие	217 (10,7%)	28 (12,9%)	9,9%
с) нарушен <i>растеж</i> (нисък/висок ръст)	565 (27,9%)	25(4,4%)	8,9 %
Група IV (594 пациенти)			
а) <i>единични</i> ВА	132 (6,5%)	8 (6,1%)	2,8%
б) <i>множествени</i> ВА/неясен дисморфичен синдром	462 (22,8%)	41 (8,9%)	14,6%
Група V (461 пациенти) <i>изоставане в НПП/УМИ и/или ASD</i>	461(22,8%)	22 (4,8%)	7,9%
ОБЩО	2026 (100%)	281	100%

При сравняване на процента разкрита патология сред групите насочени деца, очаквано най-висок процент на разкриваемост има в група Ia – 157 потвърдени от 189 насочени (83,1%).

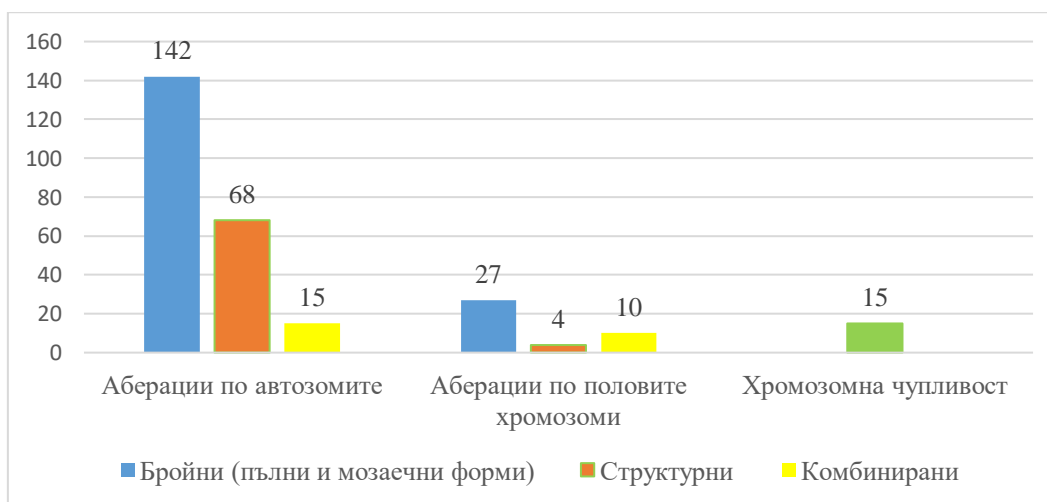
Интересен е фактът, че в подгрупата насочени деца с изолирани ВА (IVa), процентът на разкрита патология е сравнително висок – 6,1% от подгрупата (2,8% от патологията).

По отношение на разпределението на разкритата хромозомна патология по групи спрямо броя изследвани лица в групата се установи статистически значимо по-висок процент на разкриваемост в група I, в сравнение с другите две групи ($\chi^2 = 96,561$, $p < 0,00001$) (фиг.10).



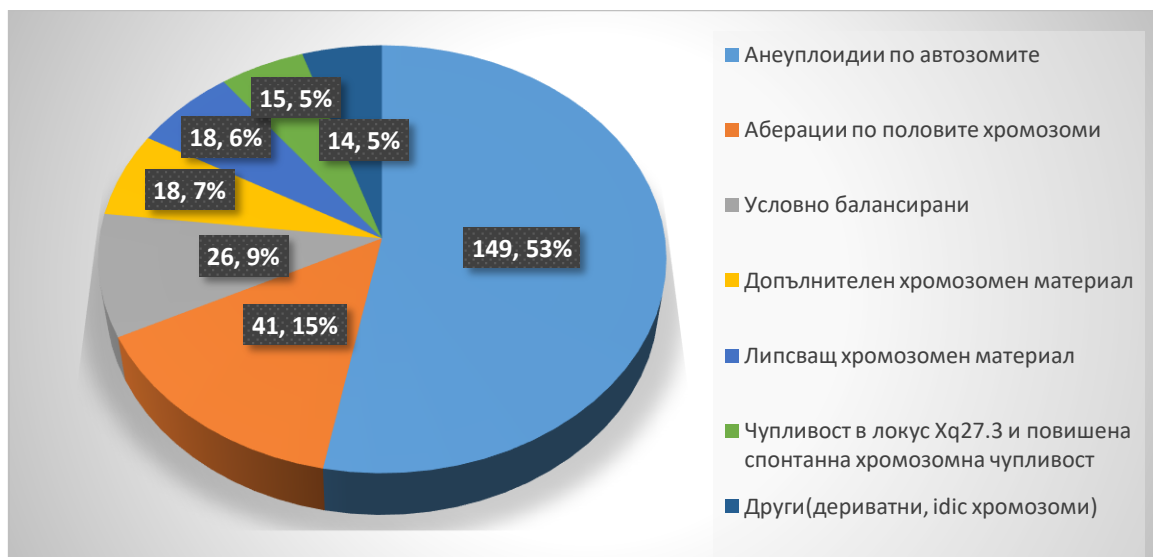
Фигура 10. Разпределение на хромозомната патология при 281 пациенти по групи показания

Разпределението по вид цитогенетични находки (Фиг.11) показва преобладаване на автозомната (80,1%), над полово-хромозомна патология, както и на бройните анеуплоидии (60,1%) над структурни (в т.ч. синдроми с хромозомна чупливост) и комбинирани хромозомни нарушения.



Фигура 11. Разпределение на патологията по вид на хромозомното нарушение

Водещата етиологична цитогенетична диагноза е представена от **бройно автозомно** нарушение (анеуплоидия), установени при 149 пациенти, съставляващи 53,0% от разкритата патология (фиг. 12).



Фигура 12. Разкрита хромозомна патология при деца за периода 2011-2020г.

По-голямата част от диагностицираните автозомни анеуплоидии – 140 (49,8% от цялата патология) е свързана с тризомия 21 (63 момичета и 77 момчета, съотношение 1:1,2) в различни форми и варианти: 130 със свободна тризомия, 5 с транслокационен вариант, 4 с мозаечна форма и една комплексна анеуплоидия с допълнителни 21 и X хромозома.

Структурни нарушения по автозомите са установени в 76 случая (27,0% от разкритата патология). Условно (микроскопски видимо) *балансирано хромозомно преустройство* се установи в 26 лица (9,3% от патологията или 1,2% от цитогенетично изследваните): Робертсонова транслокация в 4 случая (1,4%); реципрочна транслокация при 12 (4,2%); инверсия при 10 (3,5%). В останалите 50 случая (17,8% от патологията) се разкрива *небалансирано преустройство*: липсващ генетичен материал в 18 пациенти (6,4%) (2 от тях с ринг хромозома, 16 - с делеция); допълнителен генетичен материал в 8 случая (2,8%) (дубликация или неуточнен произход); към този подраздел условно причисляваме и 10 случая (3,5%) с маркерна хромозома (бройно нарушение с допълнителен материал с несигурно клинично значение и категоризация. Дериватни хромозоми са описани при 11 деца (3,9%), изодицентрични при 2, а комбинирано нарушение на инверсия и изодицентрик в 1 случай.

В 42 от случаите на структурни хромозомни аберации беше възможно изследване на родители и сибси за установяване произхода на нарушението и фамилност е намерена при 19 пациенти (45,2%).

Прилагането на хромозомно изследване за търсене на структурен дефект - цитогенетични маркери при моногенни нарушения доведе до разкриване на чупливост в Хq 27.3 локус при 10 (3,5%) лица, а повишена спонтанна хромозомна чупливост - при 5 (1,7%). Тези пациенти бяха насочени за провеждане на молекулярно-генетичен анализ за

потвърждаване/изключване на моногенна болест. В резултат на това беше поставена диагноза синдром на Чуплива X хромозома (5 момчета), Анемия на Фанкони (2 деца) и Nijmegen breakage syndrome (1 дете).

Бройни и структурни нарушения по половите хромозоми са открити при общо 41 лица (14,5% от общата патология), засягащи основно X хромозомата. Съотношението по пол показва статистически значимо три пъти по-често откриване на тези нарушения при момичета ($n=31$) спрямо момчета ($p<0,00001$, точен тест на Фишер).

Най-честата находка е потвърдената клинична диагноза на синдром на Търнър с класическа монозомия X при 7 деца (2,4% от патологията) и мозаечни варианти с бройни и/или структурни промени по X (в т.ч. изохромозома, делеция, ринг хромозома) при 16 момичета (5,6 %). Възрастта на поставената диагноза варира от 2 месеца до 17 години (средна възраст 12 години). При 5 пациенти (1,7%) - 2 с фенотипен женски пол и 3 с фенотипен мъжки пол, се разкрива монозомия X и втора клетъчна линия, съдържаща Y хромозома - цитогенетични варианти на смесена гонадна дисгенезия, а при други 2 (с фенотипен мъжки и женски пол) – кариотип 46,XX/46,XY. Полизомия X се установява при 2 момичета (0,2% от изследваните момичета), а полизомия Y - при 2 момчета (0,1 % от изследваните момчета).

Класическият синдром на Клайнфелтър с кариотип 47,XXY е потвърден при 4 момчета (1,4% от общата патология) на възраст 9, 14, 15 и 17 години (средна възраст 14 години).

Пълно несъответствие между фенотипен и генотипен пол се установява в общо 3 пациенти (1,0%) с кариотип 46,XY при фенотипен женски пол. В два от тези случаи се касае за момичета на по 17 години, диагностицирани със синдром на пълна андрогенна нечувствителност (CAIS) и синдром на Swyer, а в третия случай - за новородено с клинична диагноза синдром на Denys-Drash.

4.2.2. ДНК анализ за селективен скрининг на моногенни заболявания, наследствени предразположения към заболявания, фармакогенетични дефекти

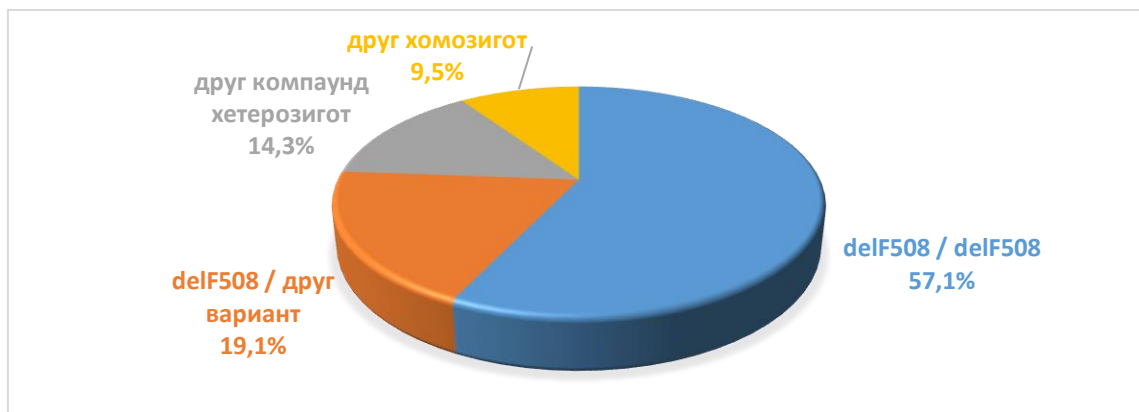
- **ДНК анализ за известни моногенни болести**

Муковисцидоза (кистична фиброза, CF)

Молекулярно-генетичен анализ за търсене на мутации в *CFTR* гена е проведен общо при 175 пациенти за 10 годишния отчетен период. Почти всички са изследвани в НГЛ. Въз основа на разкрития генотип заболяването се потвърждава при 21 (12,0%): 13 (7,4%) - хомозиготи и 8 (4,6%) - компаунд хетерозиготи. *Възрастта* на диагностицираните лица варира от 3 месеца до 16г (средно 3,1 год), като в голямото болшинство 71,4% ($n=15$) диагнозата е поставена преди 1 годишна възраст.

При други още 20 (11,4%) пациенти се открива само един патологичен вариант на гена за муковисцидоза. Всички те са регистрирани в МГК поради невъзможност за пълна диагностична покриваемост на гена *CFTR* (стандартно в годините варира между 70 и 97%).

Разпределението на доказаните пациенти *по генотип* показва преобладаване на хомозиготите по delF508, следвани от компаунд хетерозиготи с наличие на delF508, други рядко срещани компаунд хетерозиготи и хомозиготи (Фиг. 13). Най-често разкриваната мутация в *CFTR* гена е delF508, установена при 16 от 21 (76,2%) потвърдени за болестта пациенти.



Фигура 13. Разпределение на диагностицираните случаи със *CF* по генотип

Болест на Уилсън

Молекулярно-генетичен анализ за търсене на мутация в *ATP7B* гена за болест на Уилсън е проведен при 26 пациенти и заболяването е потвърдено при 6 (23,0%) от изследваните. При други 4 (15,3%) е разкрито хетерозиготно *носителство* на патогенен вариант в *ATP7B* гена, но не се открива втори патогенен алел при покриваемост на гена от 95%. Най-честата мутация установена и в хомо- и в хетерозиготен генотип е H1069Q, с изключение на едно дете (компаунд хетерозигот по две други мутации – pArg616Gln/p.Thr1092Met).

Бета-таласемия

С клинични съмнения или позитивна фамилна история за бета-таласемия са насочени за ДНК анализ на β -глобиновия ген 24 деца (10 момичета и 14 момчета), средна възраст 3,1г. Патогенни варианти в хомозиготен генотип, потвърждаващи заболяването се установяват при 6 (25,0%) от тях на средна възраст 2,1г. При други 14 (58,3%) лица се установява *носителски* генотип – 10 от тях разкрити по повод анемиен синдром и останалите 4- поради положителна фамилна история. Най-често разкривания патогенен вариант (при 10 деца) в хомо- или хетерозиготно състояние е codon 39(C>T).

- **ДНК анализ за наследствени предразположения към заболяване**

Целиакия

Молекулярно-генетичен анализ на панел от предразполагащи към целиакия алелни групи HLA-DQB1*02, DQA1*05, DQB1*03:02 е проведен при 142 деца (64 момичета и 78 момчета, съотношение 1:1,2), като при една трета, 49 (34,5%) пациенти става възможно това да бъде провеждано в ЛМГВ от началото на 2018 г. При 94 (66,2%) лица - 46 момичета и 48 момчета е установен генотип, асоцииращ с висок или много висок риск за целиакия.

Синдром на Gilbert

Молекулярно-генетичен анализ за синдром на Gilbert е проведен общо при 46 пациенти (11 момичета и 35 момчета), средна възраст 12,6 години, с основно показание необяснимо повишен неконюгиран билирубин. Провеждането на анализа в ЛМГВ стартира през 2019г. и за две години обхваща половината пациенти (23) от всички тествани за анализирания период. Хомозиготно носителство на патогенния предразполагащ вариант UGT1A1*28 е установено при 34 (73,9%) от изследваните - 7 момичета и 27 момчета (съотношение 1:3,8), като средната им възраст е 13,6г. При други 7 деца (15,2%) е установено хетерозиготно носителство.

Тромбофилия

За проучвания период 31 пациенти в детска възраст са насочени за молекулярно-генетично изследване за наследствено предразположение към тромбообразуване, поради настъпили съдови инциденти (дълбоки венозни тромбози, други съдови тромбози, мозъчен инсулт). По-голямата част (67,7%) са изследвани в ЛМГВ след 2016г, когато стартира ДНК-анализа за тромбофилия. Висок риск е установен при 6 от лицата (19,3%), въз основа на установен хетерозиготен генотип за мутантен вариант R506Q в гена за Фактор V (Фактор V Leiden), като едното дете, освен това е хетерозиготен носител и на предразполагащ полиморфен вариант G20210A в гена за фактор II (протромбин).

- **ДНК анализ за фармакогенетични дефекти**

Глюкозо-6-фосфат дехидрогеназен дефицит

Поради съмнение за X-свързания рецесивно предаван дефект в ензима глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа, е проведено скринингово изследване на кръвни петна върху филтърна бланка (G-6-PDH-colorimetric spot test) за определяне на активността на Г6ФД при 22 пациенти (17 момчета и 5 момичета в съотношение 3,4:1); в 5 (22,7%) момчета се установяват данни за Г6ФД недостатъчност, водеща до абнормна реакция към някои медикаменти, храни и инфекциозни агенти.

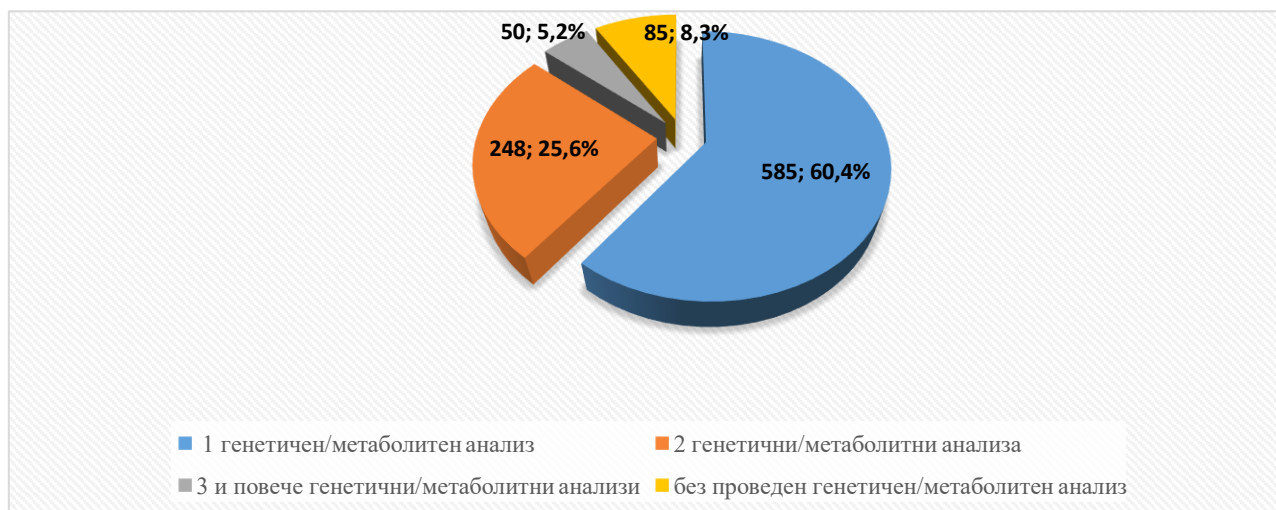
Фармакогенетични дефекти при лечение с тиопурины и кортикостероиди

Генотипиране (Real-time PCR) за най-честите алелни варианти на *TPMT* гена, кодиращ ензима тиопуринметилтрансфераза, свързан с метаболизма на тиопурины е извършено при 14 деца, нуждаещи се от лечение с лекарства от тази група и при всички тествани е установен нормален генотип (хомозиготен див тип). При 7 пациента в детска възраст е проведено генотипиране на определени полиморфизми в гените *NR3C1* и *NALP1*, оказващи влияние върху отговора на лечение с глюкокортикоиди. При 3 деца (42,8%) е установен генотип, асоцииращ с липса на отговор при лечение с глюкокортикоиди.

4.2.3. Резултати от *активна* диагностична (лабораторна и консултативна) дейност при селектирана група пациенти с генетично неуточнено / недоказано заболяване.

По-голямата част от пациентите, подлежащи на **активна** диагностична дейност (лабораторна и консултативна) са насочени към кабинета за МГК поради неясна причина за клинично нарушение и възможна генетична етиология. На тези пациенти са провеждани един или повече генетични / метаболитни изследвания, в зависимост от лабораторно-техническите и финансови възможности за периода.

При 91,2% (n=883) от общо 968 консултирани е проведен поне един вид лабораторен генетичен/метаболитен анализ (основно ЦГА) (фиг.14).



Фигура 14. Разпределение на активно консултирани пациенти по брой проведени анализи

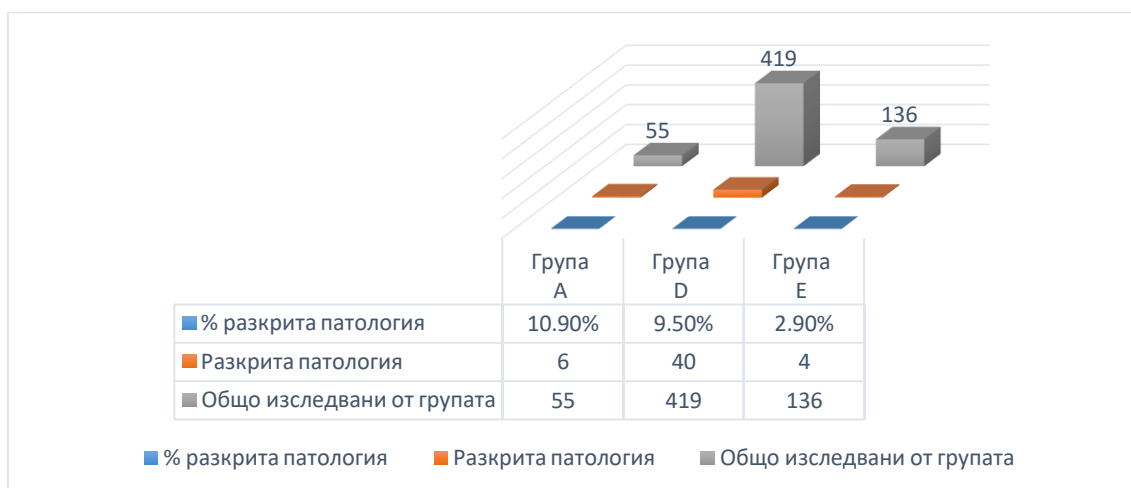
Важен извънлабораторен метод, използван като инструмент в диагностичната дейност са програмни продукти за генетична база данни по клиничен фенотип, като част от работата на генетичния консултант, особено при лица с дисморфизъм, със или без изоставане в НПР/УМИ.

4.2.3.1. Проведена в рамките на Лаборатория по медицинска генетика Варна

Конвенционален цитогенетичен анализ (ЦГА) на лимфоцитни култури

Тук са представени данните от конвенционален цитогенетичен анализ върху лимфоцитни култури само при пациенти, подлежащи на активно консултиране с неуточнена/неясна диагноза. Това са 667 лица (68,9% от общо 968 *активно консултирани* или 32,9% от общо 2026 *цитогенетично изследвани*) за проучвания период. Пълната характеристика на разкритите диагнози, в т.ч. разпознаваеми хромозомни анеуплоидии е представена в раздел „Резултати от конвенционален цитогенетичен анализ (4.2.1.).

Тук попадат предимно лица от група D (единични или множествени ВА / неясен дисморфичен синдром, със или без УМИ) - 412, следвани от изследваните от група E (нарушение в НПП) - 136 и група A (нарушение на растежа и/или половото развитие) – 55. Патологичен резултат е установен при 50 (7,5%) от изследваните. На фиг.15 е показано разпределението на селектираните пациенти с проведен ЦГА по групи показание и % разкрита патология.



Фигура 15. Разпределение на активно консултирани пациенти с проведен ЦГА по група показание и % разкрита патология

Резултатите показват преобладаване на автозомната (82,0%) над гонозомната патология и на структурните хромозомни аномалии (66,0%) в сравнение с бройните. Всички установени структурни нарушения спадат към небалансираните

Молекулярно-генетичен анализ за FRAXA синдром

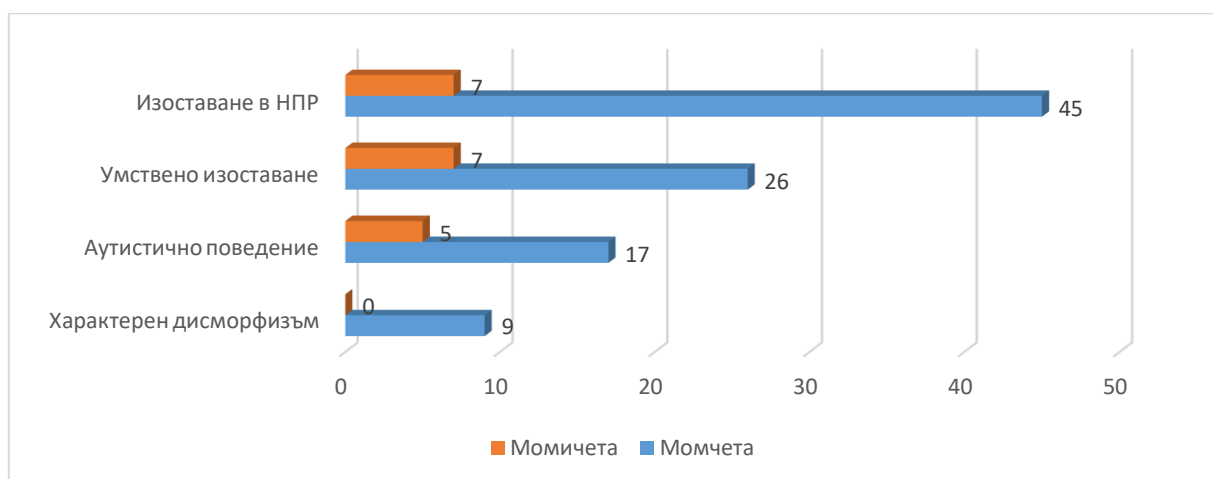
Молекулярно - генетичен анализ за FRAXA синдром е проведен общо при 105 деца на възраст от 2 до 17 години (средна възраст 6.5 години). От тях 94 (89,5%) са от мъжки пол,

а останалите 11 (10,5%) – от женски пол (М:Ж=8,5:1). Почти всички – 97 (92,4%) са пациенти по показание за насочване от група Е, а останалите 8 – от група D.

Положителен резултат за FRAXA синдром е разкрит при **6 деца** (5,7%) от 105, от мъжки пол. Четирима от пациентите са разкрити в ЛМГВ (валидирани в Национална Генетична Лаборатория), а двама са дагностицирани във външна лаборатория.

Пробите на 82 лица (78,1% от изследваните) са тествани в ЛМГВ, а на 23 - във външни лаборатории (НГЛ и ГМДЛ „Геника“). Молекулярно-генетичен **скрининг за чуплива X хромозома** във Варна става възможен след спечелване на *Научен проект (№18015)* към фонд „Наука“ на МУ-Варна (конкурсна сесия 2018г) за обхващане на ретро- и проспективно селектирана група от 52 деца - 45 (86,5%) момчета и 7 (13,5%) момичета с интелектуални затруднения и/или ASD.

Резултатите от скрининга на тези пациенти са представени по брой, пол и показание (фиг. 16). Всички подобрани пациенти са с изоставане в НПР, включително забавяне в развитието на речта.



Фигура 16. Клинично представяне на селектираната група пациенти въз основа на водещи клинични критерии за включване в проучването.

От молекулярно-генетичния анализ се разкрива, че в пробите на 3 случая (5,7%) се отчитат като амплификация на ДНК сегмента в таргетния за синдрома регион. Тези пациенти са момчета на възраст 8 (случай 1), 9 (случай 2) и 11 (случай 3) години. Техните клинични характеристики са обобщени в таблица 2. Допълнителното изследване на проби от майките на пациент 1 и пациент 2 също показват амплификация на ДНК участъка. Потвърдителният генетичен анализ в НГЛ показва, че и трите момчета носят пълна мутация, а двете майки са носителки на премутация на патологичния алел.

Таблица 2. Клинични прояви при пациентите с пълна мутация в FMR1 гена

Клиничен фенотип	Случай 1	Случай 2	Случай 3
Възраст (години)	8	9	11
Умствено изоставане (степен)	+ (умерено)	+ (леко)	+ (леко)
Изоставане в ННР	+	+	+
Аутизъм/аутистично поведение	+	-	+
Хиперактивност	+	+	+
Стереотипни движения	+	-	+
Лицев дисморфизъм	+	-	-
Макроорхидизъм	+	-	+
Повишена ставна разтегливост	+	+	-
Затлъстяване	-	-	+

MLPA анализ за микроделеционни/микродупликационни синдроми

Мултиплексна лигазно-зависима реакция на амплификация на пробата (MLPA) за чести микроделеционни/микродупликационни синдрома и/или субтеломерни аберации е проведен общо при 86 деца (39 момичета и 47 момчета). Всички изследвани са с показания за насочване от група D (единични или множествени ВА / неясен дисморфичен синдром, със или без УМИ - 68,6% (n=59) и група E (изоставане в ННР/УМИ и/или ASD) – 31,4% (n=27).

Патологични находки са диагностицирани общо при 13,9% (12 лица - 9 момчета и 3 момичета). При 5 (5,8%) случая с неясна причина за MBA и/или УМИ и/или ASD, MLPA анализът е спомогнал разкриването на генетична диагноза; при други 5– диагнозата е била клинично заподозрян синдром; при двама пациенти анализът е потвърдил/уточнил цитогенетична находка.

Анализът на пробите на 54 пациенти (62,8 % от изследваните) е направен в ЛМГВ, а на 32 (37,2%) - във външни лаборатории (НГЛ и ГМДЛ „Геника“). Приложението на MLPA скрининг за микроделеционни/микродупликационни синдроми в ЛМГВ става възможно след спечелване на гореописания *Научен проект (№18015)* към фонд „Наука“ на МУ-Варна за обхващане на про- и ретро-спективно селектирана група от 54 деца, регистрирани в кабинета за генетично консултиране.

В резултат на приложения алгоритъм на селективен MLPA анализ са разкрити 5 (9.3%) лица с микроделеции/ микродупликации, асоциирани с фенотип, припокриващ се с клинична картина при пациента (Табл. 3). Средната възраст на диагностицираните е 1,7г. Тези находки са валидирани чрез проведен микрочипов анализ във външна лаборатория.

Таблица 3. Разпределение на пациентите с разкрита патология по показание, подвид проведен MLPA анализ и резултат

Пациент	Показание	Проведен генетичен анализ	Резултат
Момче, 2 мес.	група D Обс.Prader-Willi синдром	Чести микроделеционни / микродупликационни синдроми	Делеция в регион 15q11.2
Момче, 1 г.	група D. Обс.Wolf-Hirschhorn синдром	Чести микроделеционни / микродупликационни синдроми	Делеция в регион 4p16.3
Момче, 7 мес.	група D Обс. DiGeorge синдром	Чести микроделеционни / микродупликационни синдроми	Делеция в регион 22q11.21
Момче, 6 г.	група E водещо е нарушение в НПР	Субтеломерен скрининг	Делеция в регион 1q44
Момче, 8 мес.	група D ведещ клиничен фенотип на МВА с нарушение в НПР	-Чести микроделеционни / микродупликационни синдроми - Субтеломерен скрининг	Норма Дупликация регион 14q11.2

Отклонения от проведения MLPA скрининг са установени при други 5 лица (дупликация в региони 15q11.2 и 12p13.33; делеция в региони 22q11.21 и две в 22q13.33), но микрочипов анализ при пациентите и/или MLPA при родителите не позволи тяхното категоризиране като патологични находки. При трима от пациентите изследването потвърди клинично подозираната диагноза (синдром на Prader-Willi, синдром на Wolf -Hirschhorn и синдром на DiGeorge), а при двама спомогна за разкриване на неочаквана патология (1q44 del в комбинация с 1q42.13-q44dup, и друг случай на 14q11.2 dup).

4.2.3.2. Проведена *извън* Лаборатория по медицинска генетика Варна

Микрочипов анализ за молекулярен кариотип

За проучвания период микрочипов анализ е проведен при 44 пациента в детска възраст – 4,5% от активно консултираните лица. При всички тях, той е приложен като втори или трети диагностичен / валидиращ метод, след ЦГА, а в няколко случая след MLPA. Анализът по години показва, че 74% са извършени в последните 3 години. Те са провеждани в Катедрата по медицинска генетика - София, Лабораторията по Геномна диагностика – София или извън страната. При 11 (25%) от изследваните поводът е уточняване/верифициране на патологичен резултат от извършени *цитогенетичен или MLPA анализ*. При останалите 33 изследвани (всички с нормален кариотип) поводът е множествени вродени аномалии / неясен дисморфичен синдром, със или без нарушение на НПР. Разкрита е патология при 8 пациенти (24,2%), на възраст между 1м. и 12г., средно 4,3г. (Табл. 4).

Таблица 4. Разкрити патогенни варианти при пациенти с неясна причина за МВА/УМИ

Резултат от молекулно кариотипиране	Възраст
arr[hg19] 7q11.23(72,404,312-73,771,491)x1	6 м
arr[hg19] 15q21.3q22.2(57309619x2, 57414087_62947243x1, 62986766x2)	10г
arr[hg19] Xq25q26.3(123,464,057-134,293,066)x3	1г
arr[hg19] 8p23.2 (2,625,441-4,118,569)x3	1г
arr[hg19] 5p13.2 (37,479,936-37,738,033)x3	5г
UPD(20)mat.arr[hg19]20p13p11.21(377,22625,124,088)x2htz,20p11.21q13.32(25,130,395-57,086,518)x2hmz,20q13.32q13.33(57,086,507-62,751,454)x2	5г
arr[hg19] 16p11.229238831x2, 29500252_30240067x3, 30279427x2	2г
arr[hg19] 17q25.1q25.3(73815062_76174585x3)	11г

Други молекулярно-генетични анализи за моногенни болести

От съществено значение за доказване/ валидиране на моногенни нарушения се оказват изследванията чрез методите на секвениране на ген/панел от гени (по Sanger, новогенерационно секвениране), по-рядко - метилационно специфичен PCR, MLPA и др., изработвани основно в: Национална генетична лаборатория, ГМДЛ „Геника“, Лаборатория по геномна диагностика, както и в лаборатории в чужбина.

Проведени са анализи при 167 от общо 968 (17,3%) селектирани лица, подлежащи на активна генетично-диагностична дейност. Проследяването по години на провежданите молекулярно-генетични анализи сред тази група лица показва акцент (52,1%) в последните 3 години (Фиг.17). Увеличението на броя на тези анализи последните три години в сравнение с първите три от анализирания период е 5-кратно, статистически значимо ($p < 0,00001$).



Фигура 17. Разпределение по години на проведени NGS и други ДНК анализи сред консултирани лица

Генетична диагноза е потвърдена/разкрита при **89** от изследваните пациенти (**53,3%**), на средна възраст 5,4 години. Най-голям е процентът (51,4%) на изследвани лица от **Група В** (съмнение за моногенна (неметаболитна) болест в т.ч. *наследствен раков синдром*) и най-голям е дялът на разкритите диагнози в тази група (Табл. 5).

Таблица 5. Разпределение на пациентите с проведен ДНК анализ и разкрита патология по групи на насочване

Група / показание	С проведен ДНК анализ		Разкрит патогенен вариант		
	Брой деца	% от групата	Брой	% от изследваните	% от общата патология
Група А (общо 55 деца) нарушение на растежа и/или полового развитие	5	9%	1	20%	1,1%
Група В (общо 186 деца) съмнение за моногенна (неметаболитна) болест	86	46,8%	54	62,8%	60,7%
Група С (общо 105 деца) вероятно наследствено метаболитно заболяване	12	11,4%	7	58,3%	7,9%
Група D (общо 469 деца) единични и множествени ВА / неясен дисморфичен синдром, с или без УМИ	58	12,3%	25	43,1%	28,1%
Група Е (общо 123 деца) нарушение в НПР	6	4,9%	2	33,3%	2,2%

Таргетно екзомно секвениране довежда до диагностично изясняване в 21 от 37 (56,7%) пациента, при които е приложено; цялоекзомно или клинично екзомно секвениране подпомага диагностично уточняване при 5 от 17 (29,4%) насочени лица.

Молекулярно-генетичните изследвания, направили възможно диагностицирането на 88 пациенти в детска възраст, са свързани с разкриване на **редки генетични заболявания** (Таблица 6). Прави впечатление сравнително големият брой диагностицирани пациенти с водеща неврологична/невромускулна симптоматика (включително митохондриални и някои ВГО) – 29 (32,6% от патологията).

Таблица 6. Доказани редки болести/синдроми чрез молекулярно-генетични методи за 10 год.

С неврологична симптоматика	Дисморфични / малформативни синдроми	Наследствени метаболитни болести	Заболявания, свързани с нарушен импринтинг
Спинална мускулна атрофия тип1 (4 лица)	Hutchinson-Gilford progeria синдром	Гликогеноза 1А	Silver-Russel syndrome (7 лица)
Малкомозъчна атаксия (2лица)	Beare-Stevenson cutis gyrate синдром	Болест на Niemann-Pick (3 лица)	Beckwith-Wiedemann syndrome (5 лица)
Саркогликанопатия (LGMD2C) (2 лица)	Kabuki синдром	Болест на Dent	UPD 20 mat
Dravet синдром	LEOPARD синдром	Lowe синдром	Други
Понтоцеребеларна хипоплазия тип1В (2 бр.)	Bardet-Biedl синдром	Синдром на Zellweger	Ювенилна нефронофтиза
Вродена катаракта с лицев дисморфизъм и невропатия(CCFDN)(4бр)	Анемия на Фанкони (2 лица)	Алфа-1-антитрипсинов дефицит	Синдром на пълна андрогенна нечувствителност(CAIS)
Вродена миастения (2бр.)	Nijmegen breakage синдром	Болест на Canavan	Andersen-Tawil синдром
Синдром на Rett (2 бр.)	Cartilage-hair hypoplasia синдром (2 лица)	Мукополизахаридоза тип 4	Diamond-Blackfan анемия
Мускулна дистрофия тип Дюшен (2 лица)	Cornelia de Lange синдром		Вроден хиперинсулинизъм (ABCC8 gene)
Хипомиелинизираща левкодистрофия (Н-ABC синдром) (2 лица)	Cardio-facio-cutaneus синдром	Наследствени ракови синдроми	Фамилна хемофагоцитна лимфохистиоцитоза
	Noonan синдром (5 лица)	Туберозна склероза (2 лица)	Автозомно-доминантен криопирин-асоцииран синдр.
Митохондриални болести (мутация в мт ДНК)	Mowat-Wilson синдром	Неврофиброматоза тип1 (3 лица)	Наследствена остеоидистрофия тип Олбрайт
MELAS синдром	Greig cephalopolysyndactyly синдром	Peutz-Jeghers синдром	Agima syndrome
Leigh синдром	Osteoporosis – pseudoglioma синдром	Von Hippel-Lindau синдром	Автозомно-доминантна бъбречна поликистоза (2 лица)
	Jansen de Vries синдром		Пигментен ретинит (AP)
			Ахондроплазия

Разпределението на установените диагнози по начин на унаследяване/механизъм на възникване показва преобладаване на **АР състоянията** (41,6% от патологията), следвани от АД - 33,7%, X – свързани (7,9%) и митохондриални заболявания (2,2%). Състояния, дължащи се на нарушен импринтинг са установени в 7,8% от изследваните (14,6% от патологията). Само при 6 (20%) от случаите на АД патология се касае за унаследен патогенен вариант, а в останалите 24 – за спорадично възникнало състояние. При 7 от пациентите с доказани АР болести (Малкомозъчна атаксия, Понтоцеребеларна хипоплазия тип1В, Cartilage-hair hypoplasia синдром, CCFDN) се касае за положителна фамилна история и диагнозата е разкрита по повод засегнато второ дете в семейството.

Селективен метаболитен скрининг / ензимен анализ за ВГО

Селективен метаболитен/ензимен анализ е проведен при 126 пациенти (13,0% от активно консултираните) за проучвания период, на възраст от 4 дни до 15 години (средно 3,1г),

по-голямата част - 73,0% на възраст 0-3г. Това се осъществи чрез изпращане на проби от кръв и урина в сектор по метаболомика на НГЛ – София.

Метаболитни отклонения са установени при 26 (20,6%) лица, като конкретно метаболитно заболяване е диагностицирано при 14 от 126 (11,1%) изследвани пациенти, със средна възраст 3,6 години (Табл. 7). В половината от доказаните случаи (7) се касае за лизозомна болест. Всички разкрити наследствени веществообменни заболявания (с изключение на митохондриалната болест Leigh синдром) се класифицират като моногенни нарушения с АР тип на унаследяване.

Таблица 7. Диагностицирани метаболитни заболявания

Диагностицирано метаболитно заболяване	Диагностичен метод	Възраст
Алкаптонурия	Метаболитен скрининг	2 месеца
Алкаптонурия	Метаболитен скрининг	6 месеца
GM1 ганглиозидоза	Метаболитен/ензимен скрининг	6 месеца
Левциноза (MSUD)	Метаболитен скрининг	1 месец
Метахроматична левкодистрофия	Ензимен скрининг	2 години
Мукополизахаридоза тип VI (Maroteaux-Lamy)	Ензимен скрининг	10 години
Niemann-Pick type C	Ензимен скрининг	9 години
Niemann-Pick type A/B	Ензимен скрининг, ДНК анализ	10 години
Niemann-Pick type A/B	Ензимен скрининг, ДНК анализ	15 години
Синдром на Zellweger	Метаболитен скрининг, ДНК анализ	3 месеца
Пропионова ацидемия	Метаболитен скрининг	1 година
GM1 ганглиозидоза	Метаболитен/ензимен скрининг	8 месеца
Болест на Canavan	Ензимен скрининг, ДНК анализ	1 година
Leigh синдром	Метаболитен скрининг, ДНК анализ	11 месеца

4.2.3.3. Резултати от активна диагностична консултативна дейност при селектирана група пациенти с генетично неуточнено заболяване - софтуерни онлайн-базирани програми в помощ на генетичната практика

За проучвания 10-годишен период, активната дейност на генетично консултативния кабинет при 968 пациенти бе свързана не само с лабораторно-диагностична, но и с колаборативна клинично-диагностична оценка по изясняване на синдромни или единични (несиндромни) генетични нарушения при съответно 118 (10,8%) и 41 (4,2%) пациенти.

Основна задача беше установяване на симптомокомплекс с единна етиопатогенеза при множествени аномалии въз основа на специфичен фенотип. В част от случаите диагнозата е основана/подкрепена от характерна находка от образни изследвания (Туберозна склероза, Joubert синдром, Allagile синдром и др.), специфични кожни прояви (Neurofibromatosis type1, Congenital ichthyosis, Epidermolysis bullosa, Incontinentio pigmenti и др.), характерно съчетание

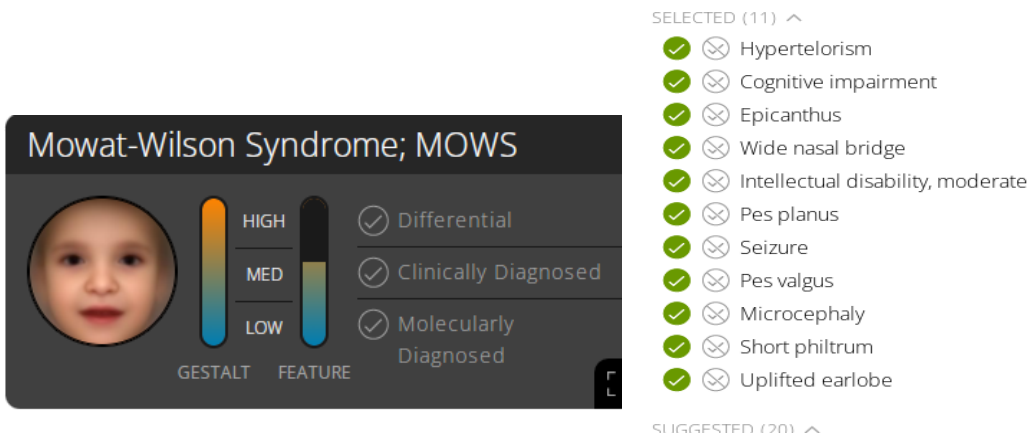
на вродени аномалии/дисморфични белези (Cornelia de Lange синдром, Holt-Oram синдром, Trichorhinophalangeal синдром, Thanatophoric dysplasia, Oral-facial-digital синдром и др.), покриване на определени диагностични критерии (Marfan синдром, Noonan синдром, Bardet – Biedl синдром и др.), характерен неврологичен статус, данни от електромиография (Атаксия на Фридрайх, Dejerine-Sottas синдром и др.), или тератогенно въздействие (Фетален алкохолен синдром, Валпроатна ембриопатия и др.), положителна фамилна история.

Важно място в процеса на диагностициране на деца със съмнение за генетично заболяване заемат **софтуерните онлайн-базирани програми и дисморфологични бази данни**. Те се оказват неизменен инструмент при диагностичното търсене, особено в групата на деца с водеща клинична картина на множествени ВА / неясен дисморфичен синдром, със или без УМИ (група D). Тук се отчита приносът на софтуерни онлайн-базирани програми с цел поставяне на клинична диагноза при деца със специфичен фенотип.

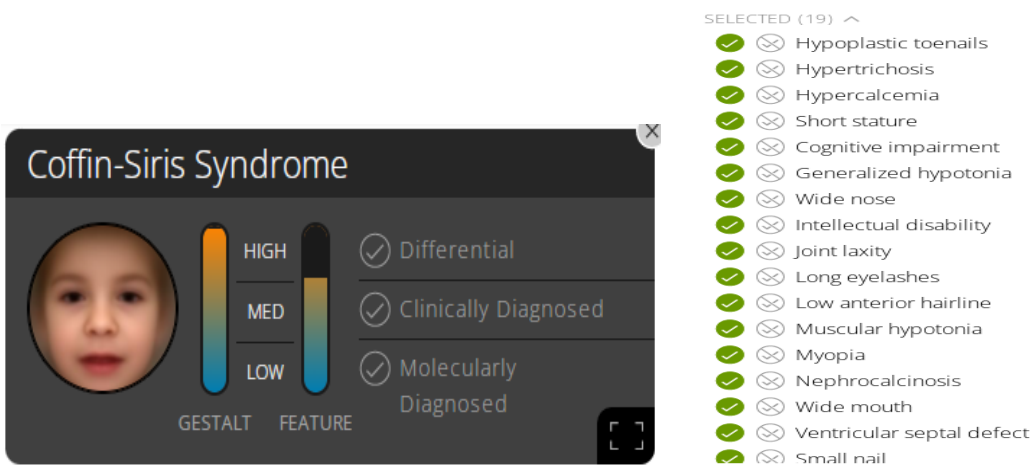
Често използвани в практиката на докторанта и специалистите от медицинска генетика са OMIM, ORPHA.NET, London Medical Database, Face2Gene, както и специализирани дисморфологични литературни справочници от типа на “Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation“ и други. След 2015г. използването на *Face2Gene* е почти задължителна част от диагностичния процес при консултиране на деца с лицев дисморфизъм (но не само) и служи едновременно и като регистър на дисморфичните пациенти. Предвид факта, че за работа с приложението програмата са необходими снимки на пациента, в някои от случаите, отказът на близките да фотографираме детето не ни позволи да я използваме.

При 53,7% (n=520) от активно консултираните лица за 10-годишния период е описан лицев дисморфизъм. Използването на програмата започва от 2016г. и до 2020г. включително са качени снимките на 214 пациенти, заедно с описание на установени малки и големи аномалии, други клинични прояви и антропометрични показатели. При 71 (33,2%) от тези случаи е потвърдена генетична или поставена клинична диагноза, като при 51 (71,8% от 71) от тях диагнозата е в първите 10 предложени от програмата (32 - 45,1% от тях на първо място).

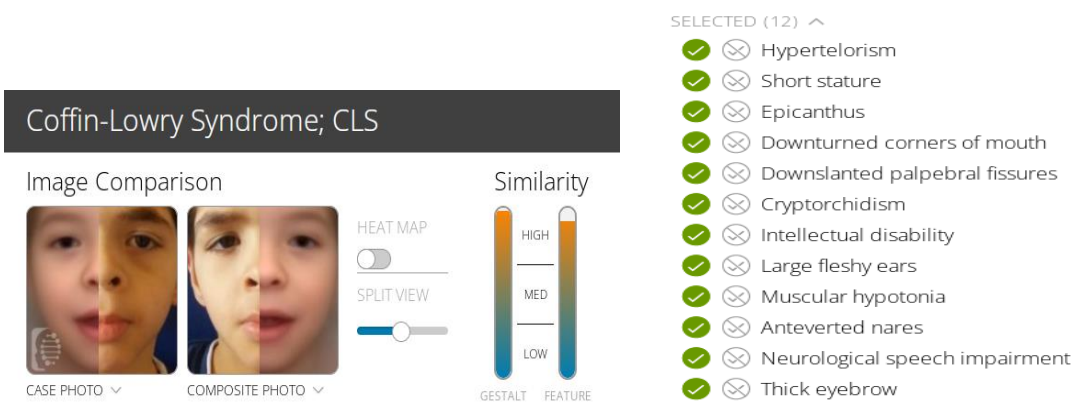
Използването на *Face2Gene* ни насочи към редки диагнози като Mowat-Wilson синдром (фиг. 18), Coffin-Siris синдром (фиг.19), Kabuki синдром, Coffin-Lowry синдром (фиг.20), Greig cephalopolysyndactyly синдром, Wiedemann-Steiner синдром и др., някои от които са генетично потвърдени. При други по-известни и разпознаваеми синдроми, като Bardet-Biedl синдром, Cornelia de Lange синдром, Cardio-facio-cutaneus синдром, Noonan синдром, Trichorhinophalangeal синдром, Silver–Russel синдром, DiGeorge синдром, Wolf-Hirschhorn синдром и други, програмата потвърди клиничното мислене.



Фигура 18. Анализ на пациент с неясен генетичен синдром с програма Face2Gene и потвърдена впоследствие генетична диагноза Mowat-Wilson синдром



Фигура 19. Анализ на пациент с неясен генетичен синдром с програма Face2Gene и приета впоследствие клинична диагноза Coffin-Siris синдром



Фигура 20. Анализ на пациент с неясен генетичен синдром с програма Face2Gene и приета клинична диагноза Coffin-Lowry синдром

4.2.4. Обобщение на резултатите

От цялостната дейност на обхванатия педиатричен контингент пациенти

В резултат на мултидисциплинарния подход на дагностициране на пациенти в детска възраст бе установена генетична и клинична диагноза общо при 696 пациенти (22,3%) от регистрирани 3124 лица в тази възраст за 10 годишен период (Табл. 8). Това са:

- 537 (17,2% от всички обхванати) пациенти са с *лабораторно* (генетично и метаболитно) доказани причини за заболяването,
- 118 (3,8%) са с клинични диагнози (синдроми)
- 41 (1,3%) са с единични (несиндромна) вродена аномалия

Таблица 8. Потвърдени и/или разкрити диагнози по категория на генетичната класификация, на пациенти в детска възраст, регистрирани в МГК за периода на обхващане

Категория на генетичното нарушение		Общо диагностициран лица от всички регистрирани в МГК		Диагностицирани лица в резултат на активна дейност на МГК	
		Брой	% от патологията	Брой	% от патологията
Хромозомни болести	Микроскопски видими небалансирани нарушения	240	34,5%	50	7,2%
	Микро (делеции/ дупликации)	18	2,6%	18	2,6%
Моногенни болести	Автозомно-рецесивни*	79 (+39*)	11,3% (17,0%*)	46	6,6%
	Автозомно-доминантни	30	4,3%	30	4,3%
	X-свързани	13	1,9%	13	1,9%
	Митохондриални	2	0,3%	2	0,3%
	Импринтинг болести	13	1,9%	13	1,9%
Наследствени предразположения – моногенни и мултифакторни	Целиакия	94	13,5%		
	Синдром на Gilbert	34	4,9%		
	Тромбофилия	6	0,9%		
	Единични (несиндромни) вродени аномалии	41	5,9%	41	5,9%
	Глюкозо-6-фосфат дехидрогеназен дефицит	5	0,7%		
	Фармакогенетични дефекти лечение(тиопурины, стероид)	3	0,4%		
Клинични диагнози		118	16,9%	118	16,9%
ОБЩО		696 (+39)	100%	331	47,6%

* брой разкрити хетерозиготи, изследвани със съмнение за муковисцидоза, бета- таласемия и болест на Уилсън

Обобщеният вид на данните от проведените лабораторни генетични изследвания при пациенти в детска възраст за проучвания период (2011-2020) са представени в *таблица 9*.

Таблица 9. Генетични/метаболитни изследвания и разкрита патология по вид анализ, при пациенти в детска възраст, регистрирани в МГК, за проучвания период

Вид проведен анализ	Брой изследвани лица	Брой лица с разкрита патология	% разкрита патология
Цитогенетичен анализ *	2026	281	13,9 %
Молекулярно-генетичен анализ за муковисцидоза	175	21 хомозиготи (21 - хетерозиготи)	12,0%
Молекулярно-генетичен анализ за болест на Уилсън	26	6 хомозиготи (4 - хетерозиготи)	23,0%
Молекулярно-генетичен анализ за бета - таласемия	24	6 – хомозиготи (14-хетерозиготи)	25,0%
Молекулярно-генетичен анализ за синдром на Gilbert	46	34	73,9%
Молекулярно-генетичен анализ за предразположение към целиакия	142	94 с висок или много висок риск	66,2%
Молекулярно-генетичен анализ за предразположение към тромбофилия	31	6 (хетерозиготи по FV и/или F II)	19,4%
Молекулярно генетичен анализ за фармакогенетични дефекти при лечение с тиопурины и кортикостероиди	21	3 - липса на отговор към КС	14,3%
Изследване за G6FD недостатъчност (G-6-PDH-colorimetric spot test)	22	5	22,7%
Молекулярно-генетичен анализ/скрининг за FRAXA синдром	105	6	5,7%
MLPA за микроделеционни/микродупликационни синдроми	86	12	13,9%
Микрочипов анализ (aCGH)	44	19	43,2%
Други молекулярно-генетични анализи (PCR, MLPA, секвениране по Sanger)	113	63	55,8%
Новогенерационно секвениране (NGS)	54	26	48,1%
Селективен метаболитен скрининг/ензимен анализ за ВГО	126	14	11,1%

* в тази категория са включени и патологичните резултати, установени при 50 (7,5%) от 667 селектирани, активно консултирани пациенти с неясна диагноза.; 39 пациенти с автозомно-рецесивна болест (муковисцидоза, бета-таласемия и болест на Уилсън) с хетерозитотен генотип на патогенен алел

В дела открита патология при автозомно-рецесивните заболявания са включени само хомозиготи, но е представен и броят на разкритите хетерозиготи. Условно добавяне на 39 пациенти с автозомно-рецесивна болест (муковисцидоза, бета-таласемия и болест на Уилсън)

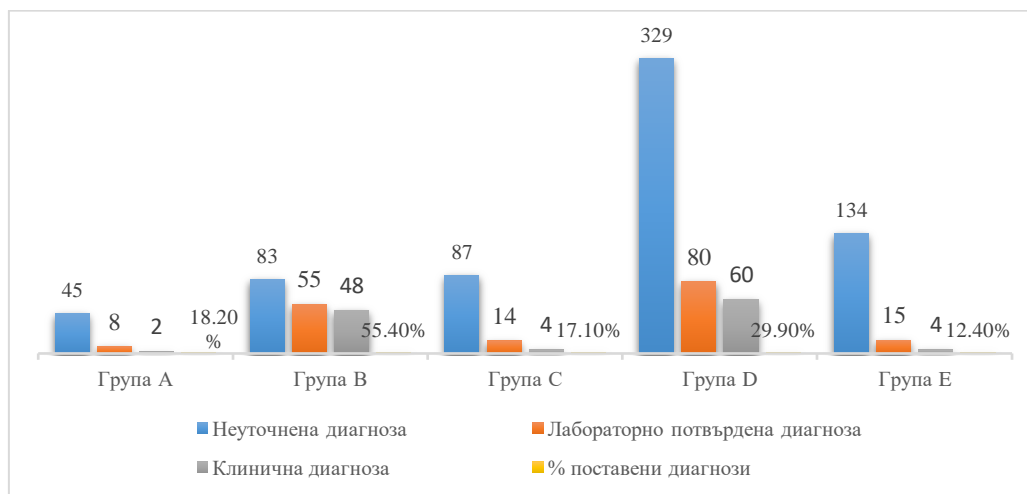
с клиничен фенотип и лабораторно установен хетерозиготен генотип при липса на втори патогенен вариант (показани в таблица 9) биха променили диагностичната разкриваемост на проучването на 735 лица (23,5%).

От активната диагностична дейност (лабораторна и консултативна) на селектирана група пациенти

Приносът само на *активната* генетико-диагностична *дейност* на МГК за изграждане на генетичната и/или клинична диагностика при пациенти с неясно / недоказано клинично нарушение, е свързан с установяване на 331 лица (34,2% от селектираната група 968 пациенти или 10,6 % от всички обхванати 3124 лица). Това са пациенти с поставени (фиг.22):

- 172 (17,7%) лабораторни диагнози: цито-/молекулярно-генетични; метаболитни/ензимни
- 118 (10,8%) клинични диагнози на заболяване/синдром със специфичен фенотип
- 41 (4,2%) единична (несиндромна) вродена аномалия.

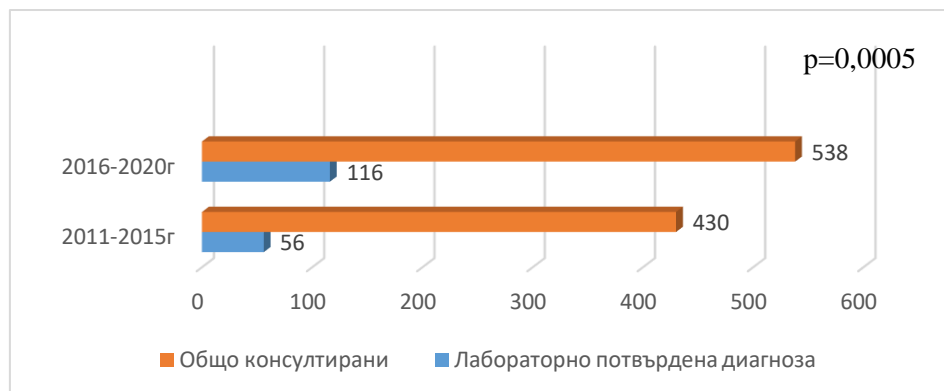
При **65,8%** не бе възможно установяване на конкретна клинична или генетична диагноза. Тук се включват не само регистрирани здрави сибси, но и липсваща информация поради невъзможно или нереализирано проследяване на пробанда / семейството и уточняващо диагностично изследване извън обхвата на настоящото проучване.



Фигура. 22. Разпределение на активно консултирани пациенти от отделните групи по насочване и разкрити/поставени диагнози

Наблюдава се ясна тенденция на увеличаване търсенето и успеваемостта на активната *диагностична дейност (лабораторна и консултативна)* за генетичното обслужване на пациентите в детска възраст. За периода 2011-2015г са консултирани 430 деца, разкрита е диагнозата при 56 (13,0%); за периода 2016-2020г са консултирани 538 лица, разкрита е

диагнозата при 116 (21,6%) (фиг.23). Приложението на непараметричния тест – Хи квадрат показва статистически значима разлика ($\chi^2 = 11,923$; $p=0,0005$).



Фигура 23. Разпределение на активно консултирани пациенти по потвърдени диагнози за първата и втората половина на анализирания период

Конвенционален цитогенетичен анализ върху лимфоцитни култури разкри 50 лица (7,5% от 667 изследваните) с единични или предимно множествени ВА / неясен дисморфичен синдром, със или без УМИ), следвани от изследваните от групата с нарушение в НПР.

Молекулярно-генетичният скрининг за FRAXA синдром разкри 6 деца (5,7% от 105 подбрани пациенти) с изоставане в НПР, поведение от аутистичен спектър, рядко с характерен дисморфизъм.

MLPA анализът за чести микроделеционни/микродупликационни синдрома и/или субтеломерни аберации разкри, потвърди или уточни общо 12 лица (13,9% от селектирани 86 деца), предимно момчета на средна възраст 1,3 г., насочени по повод множествени вродени аномалии или нарушение в НПР.

Микрочиповият анализ за молекулярен кариотип на 44 лица разкри 8 пациенти (24,2% от 33 с нормален цитогенетичен резултат) и помогна за уточняване на хромозомна или MLPA находка при други 11 пациенти също с множествени вродени аномалии, със или без нарушение на НПР.

Молекулярно-генетични изследвания, предимно ДНК секвениране, бяха проведени при 167 лица (17,1% от активно консултираните). Генетична диагноза бе разкрита или потвърдена при 89 (53,3%) лица, на средна възраст 5,4 години, всички случаи с редки генетични болести. Водещ по разкриваемост е делът (60,7%) на пациентите от група В (съмнение за моногенна (неметаболитна) болест в т.ч. наследствен раков синдром), следван от (28,1%) пациентите от група D (единични и множествени ВА / неясен дисморфичен синдром, с или без УМИ). Преобладаваща е неврологичната / невромускулна симптоматика (32,6% от патологията), а по механизъм на възникване и начин на унаследяване преобладават AP състояния (41,6%),

следвани от АД - 33,7% и X – свързани (7,9%). Предимство на методите е диагностика на митохондриални заболявания (2,2% от патологията), както и такива, дължащи се на нарушен импринтинг (14,6% от патологията).

Селективен метаболитен/ензимен анализ е проведен при 126 пациенти (13,0% от активно консултираните), предимно (73,0%) в неонатална и ранна детска възраст 0-3г. Метаболитно заболяване е диагностицирано при 14 (11,1% от изследваните пациенти), при други 12 са установени нерелевантни метаболитни отклонения.

По отношение на *финансирането* на проведените лабораторни цитогенетични и метаболитни/ензимни изследвания при консултирани пациенти – в 92% (733 от общо 793 извършени), провеждането им стана възможно с държавна субсидия (в рамките на хоспитализация). Значително по-малък е този дял при молекулярно-генетичните изследвания - процентът на държавно субсидирани пациенти (в рамките на хоспитализационен период или финансирани от Фонда за лечение на деца към МЗ) е 16,7% (67 от 402 проведени), а други 47,8% (192 от 402) са изследвани в рамките на научно-изследователски проект у нас или в чужбина. Най-съвременните високо-резолютивни геномни анализи чрез новогенерационно секвениране (NGS) са предимно лично финансирани - (63,0 %, 34 от общо 54 изследвани лица). Тези факти се констатира на фона на анализ за изследвания по години, който отчита 5-кратно, *статистически значимо* увеличение на изследваните пациенти чрез молекулярно генетични изследвания, предимно ДНК секвениране за последните три спрямо първите три години на обхванатия период (вж. фиг 27), както и че огромното болшинство - изследвания чрез микрочипов анализ - 74% е проведено в последните 3 години.

5. ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Обсъждане на резултати от *deskриптивно-епидемиологичната* характеристика на проучвания контингент

Deskриптивно-епидемиологичната характеристика на всички регистрирани пациенти

Броят проведени МГК и/или насочени проби/пациенти в детска възраст за анализ в ЛМГВ се увеличава с годините, като нарастването е почти три пъти по-голямо последните две години, в сравнение с първите две от анализирания период (Фиг.1). Тази тенденция е логична, съотнесено към нарастване броя и видовете анализи, достъпни за пациентите и популяризиране на специалността. Нарастващо търсене на генетични услуги в световен мащаб, се отчита от много автори (*Riesgraf et al., 2015; Stoll et al., 2018; Jacobs et al., 2020;*

Jenkins et al., 2021), като *Schmidtke et al.* съобщават за 70% увеличение на генетичните консултации в Германия през 2019г. спрямо 2009г. (*Schmidtke et al., 2020*).

По отношение на насочващите структури за генетично обслужване на детския контингент логично е значително по-големият дял на пациентите (82%) да са насочени от Детските клиники на Университетската болница, в която е базиран медико-генетичният кабинет. Проучване на *Diamonstein et al.* сред лекари в Тексас показва, че два пъти повече са лекарите, работещи в Университетски болници, които насочват пациенти към ГК, в сравнение с други специалисти (*Diamonstein et al., 2018*).

Около 9,1% от лицата в нашето проучване са насочвани за МГК/генетични изследвания от извънболнични специалисти, предимно педиатри с тясна специалност – ендокринолози, гастроентеролози, невролози и др. В тази група насочващи са включени и общопрактикуващи лекари, но делът на насочените от тях е изключително малък (0,7%). Обяснение може да бъде фактът, че те изпращат пациентите с вероятно генетично заболяване към специалисти, според водещата клинична проява или за хоспитализация и така, индиректно пациентите попадат в нашето ползрение. Важен фактор за насочване е и недостатъчната информираност на лекарите за генетичните заболявания и изследвания. Проучване на *Klitzman et al.* сред 220 лекари интернисти в САЩ показва, че над 80% от тях имат необходимост от обучение по отношение на генетичните анализи и показанията за насочване към специалист генетик (*Klitzman et al., 2013*). В друго проучване отново в Съединените щати като основни пречки за насочване за ГК/генетични изследвания се съобщават несигурността на лекаря кога е необходимо това, както и притесненията относно разходите за пациентите (*Truong et al., 2021*). Не може да се пропусне и фактът, че у нас услугата „Генетично консултиране“ не се заплаща от НЗОК и извънболничните специалисти и общопрактикуващи лекари не могат да предоставят безплатно направление за МГК.

В 4% от случаите, родителите/близките самостоятелно решават да проведат МГК и/или генетично изследване, най-често по повод положителна фамилна история за генетична патология. Малко по-нисък дял (1,7%) на самостоятелно насочени лица отчитат *Ковачева и сътр.* при проучване резултатите от консултативната дейност на Медико-генетичния център в Плевен с педиатрични пациенти за тригодишен период: 1994-1996г. (*Ковачева и сътр., 1998*). Вероятно броят на самонасочили се пациенти за ГК/генетични изследвания ще се повишава с годините, предвид широко разпространена информация в Интернет за редки заболявания, включително симптоми, възможности за диагностициране и все по-лесния достъп до генетични услуги. Според *Bleyer et al.* някои родители на деца с недиагностицирани редки

болести сами търсят начини за достигане до точна диагноза, поради липса на интерес, некомпетентност или прекалена натовареност на личните им педиатри (*Bleyer et al., 2020*).

Разпределянето по показание за провеждане на МГК и/или генетичен анализ на педиатричните пациенти се оказва трудна задача, предвид огромната клиничната хетерогенност на наследствените състояния в детска възраст и организационно-диагностични алгоритми. Поради това разделянето в 6 основни групи е по-скоро условно.

Най-голям е броят на лицата в **група I** - 971 (31,1%) – *вероятна хромозомна болест*. В тази група са включени не само пациенти със съмнение за разпознаваема автозомна или гонозомна (включително с нарушение в половото развитие) хромозомна болест, но и голям брой лица с отклонения в растежа (предимно нисък ръст - подгрупа Ic), без съпътстващи симптоми/аномалии. Те са насочвани основно от детските ендокринолози в болницата за провеждане предимно на ЦГА в периода след 2014 година, предвид изискване на съвременните консенсусни насоки за начална диагноза при деца с нисък/висок ръст (Фиг.4)

В **група II** са пациентите с вероятна *моногенна (неметаболитна) болест*, в т.ч. *наследствен раков синдром* – 517 (16,5%), въз основа на специфичен клиничен фенотип, покриване на определени диагностични критерии, резултати от лабораторни и образни изследвания, позитивна фамилна история. В една *подгрупа* се обособяват лица с клинична диагноза/съмнение за *относително* по-чести и известни моногенни болести - *муковисцидоза* и *бета таласемия*. Те са насочвани основно от педиатричните клиници за съдействие при провеждане на генетичен анализ. Втора *подгрупа* са лица с водеща *неврологична / невромускулна симптоматика* и съмнение за моногенна болест (вкл. митохондриална болест). Изключително добра е колаборацията с детските клинични невролози и доболнични специалисти, които често търсят нашето мнение и съдействие при съмнение за генетична патология (насочвани от тях пациенти попадат и в другите групи показания - съмнение за ВГО, аномалии на ЦНС, МВА/неясен дисморфичен синдром, нарушение в ННР). В трета *подгрупа* са включени пациенти с клинична диагноза на *разпознаваема моногенна болест/синдром*. Тук разнообразието е много голямо: заболявания на скелетната и съединителната тъкан (Ахондроплазия, Остеогенезис имперфекта, Marfan синдром, Ehlers-Danlos синдром и др.); сърдечно-съдовата система (Хипертрофична кардиомиопатия, Andersen-Tawil синдром, Holt-Otam синдром) отделителната система (автозомно-доминантна бъбречна поликистоза, Alport синдром), зрението (Пигментен ретинит, Фамилна блефарофимоза), слуха (Вродена глухота), кожата (Congenital ichthyosis, Epidermolysis bullosa, Incontinentia pigmenti), хематологични заболявания (Анемия на Фанкони, Хемофилия), наследствени ракови синдроми и предразположения (Неврофиброматоза тип1, Туберозна склероза, Peutz-Jeghers синдром)

както и сравнително добре познати малформативни моногенни синдроми като Noonan синдром, Bardet-Biedl синдром, Cornelia de Lange синдром и други. Цялото това многообразие от насочващи диагнози показва изключителната клинична хетерогенност на генетичните заболявания в детска възраст, засягащи различни органи и системи.

Очаквано голям -745 (23,8%) е дялът на насочените пациенти от **група IV**, които са с водеща клинична картина на *единични или множествени вродени аномалии / неясен дисморфичен синдром*, със или без УМИ. Като се изключи подгрупата на тези с видимо единични вродени дефекти, повечето от останалите пациенти са с неясно съчетание на множествени аномалии или дисморфизъм. Изключително добра е колаборацията с детските ендокринолози в болницата, които освен че са основните насочващи специалисти на пациенти с редки заболявания/синдроми, са и много добре подготвени в клиничното им диагностициране, лечение и проследяване. От 2016г. към УМБАЛ “Света Марина“ функционира Варненски експертен център по редки ендокринни болести, който е и част от Европейската мрежа за редки ендокринни заболявания (Endo ERN). Центърът разполага с мултидисциплинарен екип и е специализиран и сертифициран в диагностицирането, лечението и проследяването на пациенти с нарушения на половата диференциация и пациенти с вроден хиперинсулинизъм. Освен тези заболявания екипът е специализиран и в други редки заболявания, като синдром на Turner, Noonan, Silver-Russel, Prader-Willi и други. Със стартиране дейността на центъра се увеличават и насочените към МГК/генетични изследвания лица с редки болести в последните три години от проучвания период.

В нашето проучване 473 (15,1%) от всички насочени пациенти попадат в **група V** - лица с водещ клиничен фенотип на нарушение в нервно-психичното развитие (НПР) (забавяне, УМИ, поведенчески прояви – нарушения от аутистичния спектър). Това са предимно момчета (83%), като по-голямата част от тези пациенти са насочвани за цитогенетичен анализ и/или молекулярно-генетичен скрининг/ диагностика за синдром на чуплива X хромозома. Смята се, че нарушение в НПР/ УМИ и/или разстройство от аутистичния спектър са чести показания за насочване на педиатрични пациенти към МГК/генетично изследване (*Pletcher et al, 2007*). Възможно е техният брой да е подценяван поради факта, че все още недостатъчно лица с тези проблеми имат достъп до генетични услуги (*Savatt and Myers, 2021*).

Дескриптивно-епидемиологичната характеристика на селектираната група пациенти.

В тази група се акцентира на консултиране на пациенти, при които се касае за **активно** участие на генетичен консултант в процеса на поставяне на генетична диагноза на неясно или непотвърдено нарушение/синдром. Броят проведени МГК се увеличава с годините, аналогично на увеличението и в общата група, макар че спрямо трендовия модел (фиг.6) се

предвижда плавно нарастване на този брой, вероятно заради пандемичната обстановка последната година от проучвания период. Въпреки това очакванията са за все по-голямо търсене и предлагане на генетични изследвания (особено NGS технологии) (*Lalonde et al, 2020*), които налагат прецизен и подробен анализ на генотипно-фенотипната корелация чрез генетичното консултиране.

Показанията за насочване в селектираната група лица се припокриват до голяма степен с показанията на общата група, но значително по-малък е броят на пациентите в група А спрямо аналогичната група I. По повод нарушение на растежа (нисък/висок ръст без съпътстващи симптоми / аномалии) или нарушение в половото развитие **активно** са консултирани 55 спрямо общорегистрирани 565 лица с отклонения в ръста и 406 лица със съмнение за хромозомна болест. Обяснението се дължи на критериите за оформяне на селектирана група пациенти, в която не са включени такива с разпознаваеми хромозомни болести и с нарушения на растежа, насочвани основно за цитогенетичен анализ.

Очаквано най-честото показание за консулт с медицински генетик е съмнение за неясен дисморфичен синдром/МВА със или без УМИ - почти 50% от всички насочени. Тенденцията за постоянно увеличаване броят на пациентите в тази група очаквано ще се запази поради разширяване възможностите за анализ чрез молекулярно кариотипиране или други методи с високи резолютивни възможности.

5.2. Обсъждане на резултати от проведени генетични и метаболитни изследвания

5.2.1. Конвенционален цитогенетичен анализ

Цитогенетичният анализ е основен метод за диагностика на заболявания и състояния, свързани с нарушения на хромозомите и е една от основните дейности на Лабораторията по медицинска генетика във Варна. Наблюдава се ясна тенденция към увеличаване на броя проведени изследвания (фиг.8). Предвид постоянното развитие и навлизане на съвременните иновативни технологии очакванията са тази тенденция да се промени, без да се отмени.

По отношение на откритата цитогенетична патология от 13,9% (281 от 2026 изследвани), процентът е съпоставим, но малко по-нисък спрямо подобни проучвания сред тази възрастова група, вариращ от 16,6 до 17,6% (*Navsaria et al,1993; Rauch et al,2006; Grozdanova et al,2017*) и значително по-нисък спрямо други, отчитащи патология от 39 до 50,6% (*Thillainathan et al, 2015; Uwineza et al, 2016*). Тази голяма разлика може да бъде обяснена с критериите за подбор на пациенти в цитираните проучвания при които са включени лица в детска възраст с много вероятна хромозомна болест, за разлика от изследваните от нас пациенти, които не са тясно селектирани. С това се обяснява и високият процент разкрита патология при пациенти

от групи по насочване Ia и Ib (вероятна автозомна и гонозомна ХБ) – общо 65,8% (табл.1), в сравнение с другите групи лица с по-малка вероятност за ХБ.

Най-често диагностицираното хромозомно нарушение в нашето проучване е тризомия 21 (синдром на Даун) - 50% от разкритата хромозомна патология. Същият дял на Т21 се съобщава от Grozdanova et al. при 10 годишно проучване сред цитогенетично изследвани български деца (*Grozdanova et al, 2017*), както и от други автори (*Dayakar et al, 2010; Mao et al, 2015; Thillainathan et al, 2015*). В други цитогенетични проучвания сред педиатрични пациенти с МВА/УмИ, този процент е по-висок и варира от 62 до 78% (*Khalid et al, 2018; El-Attar et al, 2021; Mohammed et al, 2011; Uwineza et al, 2016*).

Цитогенетичният анализ се е утвърдил като важна първа стъпка в общия план за генетично изследване в диагностичния алгоритъм на състояния, свързани с нарушения в половото развитие. Прави впечатление обаче, сравнително малкият брой установени от нас случаи с аберации на половите хромозоми – 41 (14,5%), в сравнение с автозомните (фиг.11). Тази ниска честота, съобщавана и от други автори (*Mao et al, 2015, Uwineza et al, 2016*), вероятно се дължи на факта, че такива пациенти са много по-леко фенотипно изявиени, в сравнение с тези с автозомни нарушения и често се консултират в по-късна възраст по повод изоставане в пубертетното развитие или дори инфертилитет. Съотношението по пол показва статистически значимо три пъти по-често откриване на тези нарушения при момичета спрямо момчета, каквото съотношение съобщават и Mao et al., при 183 диагностицирани педиатрични пациенти с хромозомни нарушения по половите хромозоми (*Mao et al., 2015*).

Нашите данни потвърждават резултати от проучвания, показващи, че въпреки високата популационна честота на синдрома на Клайнфелтър (1:500-1:1000 мъже), само 25% от случаите биват диагностицирани, основно при възрастни лица по повод инфертилитет и по-рядко по време на пубертета (*Bonomi et al, 2017*). Най-често разкриваната гонозомна хромозомна болест при нашето проучване е синдром на Търнър – 23 момичета (8,2%); честота съпоставима със съобщавани в литературата - от 2% до 20% сред цитогенетично изследвани педиатрични пациенти (*Mao et al., 2015; Uwineza et al, 2016; Thillainathan et al, 2015*). Ранно поставената диагноза е изключително важна за навременно лечение с приложение на рекомбинантен растежен хормон за подобряване на крайния ръст и заместителна терапия с полови хормони, както и за цялостно проследяване (*Gravholt et al, 2019*). Както се коментира от Rankova et al. в проучване за опита им от лечение с рекомбинантен растежен хормон при момичета със синдром на Търнър, проблем е все още недостатъчното разпознаване на това състояние от общопрактикуващи лекари и педиатри и в повечето случаи - късно насочване към ендокринолози за лечение (*Rankova et al, 2021*).

Структурни автозомни хромозомни нарушения се установяват при 76 лица (27,0% от патологията). В това число са включени 40 (14,2%) случая с доказано клинично значение, 26 (9,3%) с неизяснено напълно влияние на условно балансирано преустройство и 10 (3,5%) случая с неясен/ спорен фенотипен импакт от маркерни хромозоми. По литературни данни нашите стойности са близки до тези, докладвани от Мао et al.(26,7%) и по-високи от други проучвания, съобщаващи честота на структурни автозомни преустройства от 10% (*El-Attar et al, 2021*), 18,5-19% (*Duarte et al, 2004; Khalid et al, 2018*) до 21,4-23% (*Mohammed et al, 2011; Dayakar et al, 2010*).

5.2.2. Резултати от ДНК анализ за моногенни заболявания, наследствени предразположения към заболявания, фармакогенетични дефекти.

Муковисцидозата е едно от най-честите, тежки автозомно-рецесивни заболявания за бялата раса, като проучвания за България показват, че 1/33 са носители на патогенен вариант в *CFTR* гена, а честотата на засегнатите е около 1:3600 (*Савов, 2011*). Резултатите ни показват, че най-често разкриваният вариант в *CFTR* гена при потвърдените лица е delF508 (76,2%) (фиг.13). Сходен, но малко по-висок процент (83%) съобщава *Савов*, без ограничение на възрастови граници (*Савов, 2011*). Проучване на *Petrova et al.* показва по-нисък процент на delF508 (55%), сред 140 изследвани български пациенти, за сметка на такива, разкрити чрез NGS за търсене на редки варианти (*Petrova et al, 2019*). Със създаването на експертен център по муковисцидоза в УМБАЛ „Света Марина“ - Варна през 2019г., се очаква повишение в обхвата на пациентите със CF от района на Североизточна България. Центърът функционира към Втора Детска клиника на Варненската Университетска болница „Св. Марина“.

Консултирането и организацията по изследване на пациенти за *болест на Уилсън* са един от приоритетите на работата в ЛМГВ, (стартирала в далечната 1997г), мотивирана от възможността за провеждане на ефективна терапия. За проучвания период 2011-2020 диагнозата е потвърдена при 23% от изследваните пациенти в детска възраст. Мутацията *H1069Q* се установява при 90% от установените хомо- и хетерозиготи. Това е най-често разкриваният патогенен вариант сред български пациенти (*Todorov et al, 2005; Mihaylova et al, 2012*), както и при пациенти от Централна и Източна Европа (*Medici et al, 2019*).

Сравнително малък е броят на консултираните и изследвани лица в детска възраст за проучвания период със съмнение за *бета-таласемия* - 24, въпреки високата честота за България на тази иначе рядка болест (носителството на ген за бета-таласемия в нашата популация е 2.4-2.5%). От проведените генетичен анализ за бета таласемия 24 лица, при 20 (83,3%) са разкрити патогенни варианти - хомо- и хетерозиготи, което вероятно се дължи на прецизното им селектиране, на база клиника, лабораторни изследвания, данни от

електрофорезата и фамиленост на тези, които са насочени. Остават, обаче, извън ползрението на клиницистите родственици първа степен нуждаещи се от генетично изследване/МГК, което е с важни последствия по отношение на репродуктивния риск в семейството.

За наследствени предразположения при нарушения с мултифакторна етиология, (синдром на Gilbert, целиакия и тромбофилия) са изследвания общо 219 лица, насочвани за изследвания от лекуващите ги педиатри.

Синдромът на Gilbert е доброкачествено състояние, най-често срещаното наследствено нарушение на метаболизма на билирубина, характеризиращо се с повтарящи се епизоди на жълтеница. Данните показват, че половината (50%) от проведените изследвания за синдром на Gilbert за обхванатия период са от последните 2 години, което вероятно е свързано и със стартирането на молекулярно-генетичния анализ в ЛМГВ през 2019г. (*Георгиева и сътр., 2021*). Високият процент на генетично потвърдени лица (73,9%) може да се обясни с високата честота на това състояние (засягащо 5-10% от популацията (*Wagner et al, 2018*), както и на добре селектираните за изследване лица.

Целиакията (глутенова ентеропатия) също е често срещано мултифакторно състояние, проявяващо се като хронично мултисистемно имуномедирано заболяване при консумация на хранителни продукти, съдържащи глутен при генетично предразположени индивиди. Установено е, че засяга около 1% от населението по света (*Ludvigsson et al, 2019*), като проучвания показват, че по-голяма част развиват симптоми преди 10 годишна възраст (*Lebwohl et al, 2021*). Най-добре проучени и с най-голямо участие в генетичната предиспозиция са гените на човешкия левкоцитен антиген от клас II (HLA), известни като HLA-DQ2 и DQ8. Високият процент разкрити пациенти с висок риск за целиакия в нашето проучване (66.2% от изследваните) е свързано с добре селектираните за изследване лица, въз основа на характерни симптоми, положителни имунологични маркери и фамилен история. Стартирането на генетичния анализ за предразположение към целиакия в ЛМГВ през 2018г. и провеждането на кампания с възможност за безплатни генетични изследвания, даде възможност за популяризиране на състоянието (*Георгиева и сътр., 2018*).

Изследването за *наследствена тромбофилия* при пациенти в детска възраст със съдови инциденти е препоръчително, най-вече с цел провеждане на вторична тромбопрофилактика при висок риск (*van Ottem, 2017*). За анализирания 10-годишен период, са изследвани 31 пациенти като при 6 от тях (19,3%), всички с венозни тромбози се установи висок риск за тромбофилия (хетерозиготен генотип за полиморфизъм R506Q в гена за Фактор V).

5.2.3. Обсъждане на резултати от активна диагностична дейност (лабораторна и консултативна) при селектирана група пациенти с генетично неуточнено заболяване

5.2.3.1. Лабораторна дейност извършена в ЛМГВ

Цитогенетичен анализ (виж 5.2.1.)

Молекулярно-генетичен анализ за FRAXA синдром

Синдромът на чуплива X хромозома е най-честата унаследена причина за УмИ и водеща моногенна причина за аутизъм (*Lozano et al, 2016*). Тъй като клиничните симптоми често са неспецифични, тестването за мутация в *FMR1* гена обикновено е част от основната генетична оценка в случаите на деца, основно момчета, със забавяне в развитието, УмИ и/или поведенчески проблеми (*Spector et al, 2021*).

Честотата на пациентите, доказани с FRAXA синдром, установена в нашето проучване 5,7% (6 от 105 изследвани) е в съответствие с литературните данни, докладвани за лица със забавяне в развитието: 2–9% (*Ciaccio et al, 2017; Rzońca et al, 2016; Dean et al, 2019*). Подобни резултати се съобщават и от *Л.Ангелова* при популационно-генетично проучване на 290 български пациенти в училищна възраст с УмИ, при използване на цитогенетичен метод (*Ангелова, 1994*). Авторът докладва за 5,9% честота на синдрома (5 момчета и 1 сиблинг момиче) в клинично селектирана група от 76 момчета и 25 момичета. По-висок процент (12,5%) на диагностицирани пациенти с FRAXA синдром чрез молекулярно-генетичен анализ описват *Todorov et al.*, но при селектирана група от 32 момчета с клинична диагноза синдром на Чуплива X хромозома (*Todorov et al, 2010*).

Във връзка с усилената разработка на терапия за този синдром се поставя въпроса за необходимост от популяризиране на скрининговия подход за изследване на момчета със забавяне на развитието/УмИ, основно речево забавяне, извън по-широкия клиничен спектър. И двата пола показват широк спектър от обучителни нарушения в контекста на нормално, гранично IQ или лек до тежък интелектуален дефицит (*Ciaccio et al, 2017*). В нашето проучване, и трите диагностицирани момчета имат забавяне в развитието, особено говорното, оформящо се като патогномоничен белег за синдрома, заедно с леко (случай 2, 3) до умерено УмИ (случай 1) и хиперактивност. Наблюдавано е и аутистично поведение, дефицит на вниманието (случай 1 и 3), агресия и автоагресия (случай 3). Нарушения от аутистичния спектър, оценени от някои автори (*Ciaccio et al, 2017; Kaufmann et al, 2017*) като коморбидност на заболяването, се установяват при 30–50% от мъжете и 25% от жените с този синдром.

В ерата на молекулярната диагностика на FRAXA, синдромът все още е труден за разпознаване и диагностициране, което може да се дължи на липсата на очевиден фенотип при раждането и наличието на дискретни прояви през предпубертетния период. Резултатите от

различни проучвания показват средна възраст на диагностициране между 3 и 6,3 г. (*Rzońca et al, 2016; Cotter et al, 2016; Bailey et al, 2009*). Средната възраст при поставяне на диагноза в нашето проучване е 9,3 г.- по-голяма, в сравнение с други проучвания и това може да се обясни до известна степен с липсата на молекулярна диагностика за FRAXA, извършвана рутинно и реимбурсирана на национално ниво. Известно е, че забавянето на диагнозата намалява шанса за ранна интервенция и достъп до програми за подкрепа на семейството.

MLPA анализ за микроделеционни/дупликационни синдроми

Вариациите в броя копия (CNV), наричани още микроделеции и микродупликации представляват често срещана причина за нарушение в НПР/УМИ/МВА (*Ceroni et al, 2018*). Един от молекулярно-генетичните методи, които могат да се използват за доказване на такъв вид нарушения е MLPA - бърз, чувствителен, специфичен и надежден скрининг метод, подходящ за рутинна диагностика.

Установеният процент разкрити диагнози чрез MLPA при наши пациенти – 13,9% (12 диагностицирани от общо 86 изследвани за 10-годишния период) корелира с други проучвания, вариращ от 5 до 23% (*Damnjanovic et al, 2015; Santa María et al, 2016; Ceroni et al, 2018; Miclea et al, 2021*), но резултатите зависят много от критериите за подбор, брой пациенти, брой и видове използвани сонди в китове за MLPA. Само от проведения в ЛМГВ селективен MLPA скрининг при про- и ретроспективно подбрани 54 лица в детска възраст с неясна причина за изоставане в НПР/ МВА/УМИ се установи генетична диагноза при 5 от тях (9,3%), със средна възраст 1,6 години (*Стоянова и съавт., 2020*).

Изключителната клинично-генетична хетерогенност на микроделеционните синдроми ги определя като диагностично предизвикателство, както за разпознаване на специфичния фенотип, така и за приложението на адекватно генетично изследване. Оптимални резултати биха могли да се достигнат при първоначална насоченост за конкретна нозологична единица или група от състояния със сходна патогенеза и позната молекулярна етиология. Смята се, че именно генетичният консултант, като част от мултидисциплинарния екип, спомага за ефективното прилагане на стъпки от генетични анализи (*Patch et al, 2018*). Такива например са случаите на потвърдени синдром на Prader Willi, синдром на Wolf Hirschhorn и синдром на DiGeorge с MLPA анализ. Разкритите делеция в 1q44 и дупликация в 14q11.2 региона са находки, несвързани с известни често срещани микроделеционни/микродупликационни синдроми. Припокриването на клинична картина при нашите пациенти и съобщените в литературата, дава основание за приемане на разкритото преустройство като вероятна патогенетична причина (*www.orpha.net; Shelby et al, 2021*).

Подходящ метод както за потвърждаване/отхвърляне на откритите отклонения, така и за уточняване на ангажирания генен регион в делетиран/дуплициран участък (генотипно-фенотипна корелация) е микрочиповата техника, с възможност за анализ на целия геном. И петте случая с установени от нас нарушения с MLPA са валидирани с независима техника (основно микрочипов анализ).

5.2.3.2. Лабораторна дейност извършена извън структурите на ЛМГВ

Микрочипов анализ

Микрочип-базираните методи позволяват цялостен геномен скрининг, съчетан с висока резолюция, поради което от няколко години се препоръчват като първи диагностичен тест при пациенти с необяснимо забавяне в развитието, УМИ, аутизъм или МВА, вместо стандартното кариотипиране (*Miller et al, 2010*).

В нашето проучване, този вид анализ е прилаган като втори или дори трети диагностичен (валидиращ) метод, след конвенционален ЦГА, а в няколко случая след MLPA анализ. Проведен микрочипов анализ имаме при само 44 (4,5% от активно консултираните 968 лица). Патогенни варианти са установени общо при 19 деца (43,2% от изследваните), като в тях се включват както новооткрити, така и валидиращи случаи.

Сред лицата с неясна причина за МВА/дисморфизъм/нарушение в НПР (общо 33) патогенни варианти са установени при 8 (24,2%). Тази честота е в съответствие със съобщаваната в литературата, варираща от 13% до около 27% сред деца с необяснимо УМИ със или без МВА/дисморфизъм (*Perez et al, 2017; Lee, 2018; Ceroni et al, 2018; Pinheiro et al, 2020; Liu et al, 2022, Perovic et al, 2022*). За България проучвания сред деца с УМИ и вродени аномалии посредством агау CGH са провеждани от *Хаджидекова (2011), Стоева (2012), Михайлова (2017)*, като съобщената честота на микроструктурни хромозомни аберации варира от 13,2% до 17.3%.

Предвид високата си диагностична ефективност и все по-лесния достъп на пациентите до микрочиповия анализ, би следвало и у нас той да се прилага като метод на първи избор при пациенти с необяснимо УМИ/МВА.

Други молекулярно-генетични изследвания

Предвид факта, че в ЛМГВ не се извършват всички актуални молекулярно-генетични анализи (извън MLPA за микроделеционни/микродупликационни синдроми и ДНК анализ за FRAXA скрининг) на множество редки състояния, в активната лабораторно-диагностична дейност на селектирана група пациенти се приложи активна колаборация с изпращане на проби във външни лаборатории.

Броят на изследваните пациенти в тази категория – 167 от 968 (17,3%) е сравнително малък. При 65 лица, при които анализите са осъществени благодарение на държавна субсидия или чуждестранен изследователски проект, контактът със съответните лаборатории/изследователи е осъществявана с участието на генетичен консултант – докторант и колеги. Благодарение на подобна колаборация са изследвани и диагностицирани пациенти със съмнение за RAS-опатии, импринтинг болести, автозомно-доминантна бъбречна поликистоза, редки и ултраредки болести като Beare-Stevenson cutis gyrate синдром, Hutchinson-Gilford progeria, Cartilage-hair hypoplasia, болест на Dent, Lowe синдром и др.

Не е учудващ факта, че по-голяма част (>50%) от тези молекулярно-генетични изследвания са провеждани през последните 3 години от обхванатия период с *петкратно* увеличение на обхванатите пациенти спрямо първите 3 отчетни години (Фиг.17). Особено отчетливо е нарастналото прилагане на най-съвременен анализ - новогенерационно секвениране (NGS) - 45 изследвани (> 80% дял) за последните 3 години. Въпреки, че са разработени и въведени преди около 15 години, предлагането му на българските пациенти остава ограничено, а самофинансирането му – все още обичаен факт за семействата на пациентите.

Безспорно е предимството на NGS технологии, отличаващи се с бързина, по-висока чувствителност, разграничителна способност и съпоставимо по-ниски разходи в сравнение с класическото секвениране по Sanger на отделни гени (*Kulski et al, 2016*). Проучване на Stark et al. сред 80 селектирани лица със съмнение за моногенна патология, на възраст 0-2 години, отчита значително по-голяма диагностична успеваемост (57,5%) при проведен WES в сравнение с класическото или таргетно секвениране или метилационен анализ (13,7%) (*Stark et al., 2016*). При все това, всеки клиничен случай е индивидуален и изисква познания и опит в предимствата и недостатъците на първо и второ поколение секвениране и показания за прилагане на високотехнологични възможности (WGS, WES, CES и т.н.). В това отношение от изключителна важност е добрата колаборация със специалистите по лабораторна генетика.

Достигане до окончателна генетична диагноза при пациенти с редки/ултраредки генетични болести може да се окаже продължителен и труден процес и те често се подлагат на т.нар „диагностична одисея“ (*Macnamara et al, 2019*). С приложението на NGS технологиите има голяма вероятност за значително скъсяване на този процес (*Abou et al, 2016*). Към настоящия момент обаче, както за нашата страна, така и във високо развити икономически държави, приложението на високорезолютивни анализи при пациенти със съмнение за генетично заболяване не е рутинно прилаган подход (*Strande et Berg, 2016*). Причините за това са не само финансови, но и аналитични ограничения. Касае се за трудности при интерпретация

на резултат с биоинформационни данни за вариант с несигурно клинично значение (VUS), докладване на случайни или вторични находки при провеждане на WES или WGS, повторени ДНК секвенции, които не могат надеждно да се откриват.

Високият процент разкрита/потвърдена патология (53,3%) при 89 от 167 изследвани може да се обясни с добрата обработка на клиничния фенотип на пациентите и правилен подбор на най-подходящ генетичен метод. В случаите на неясна диагноза, подходът за избор включва предложение за цялоекзомно (WES) или клинично екзомно (CES) секвениране. В нашето проучване разкриваемостта от приложение на тези анализи възлиза на 29,4% , което кореспондира на литературните данни, въпреки несравнимо по-малкия брой пациенти при нас. Голям брой проучвания чрез прилагане на WES или WGS при пациенти в детска възраст със съмнение за генетично заболяване и различни клинични прояви съобщават за диагностична успеваемост от 25% до 49% (*Stark et al, 2016; Tan et al, 2017; Costain et al, 2020; Zhang et al, 2021*). У нас изследвания чрез NGS при пациенти на различна възраст с редки болести и съмнение за моногенно заболяване провежда Вържарова и докладва за висок процент на разкрита генетична причина - 48% (21 от 43 изследвани) (*Вържарова, 2016*).

Интерес представлява значимият брой на генетично диагностицираните пациенти с редки и ултраредки дисморфични синдроми (23,6%) и импринтинг болести (14,6%) (Табл.6). Някои от малформативните синдроми са заподозрени и диагностицирани още в неонаталния период (Beare-Stevenson cutis gyrate синдром, Nijmegen breakage синдром и др.) или в кърмаческа и ранна детска възраст (Анемия на Фанкони, Cartilage-hair hypoplasia синдром, Greig cephalopolysyndactyly синдром) поради специфичен фенотип, лабораторни/ образни изследвания. Други пациенти получиха ясна генетична диагноза на 12-13 годишна възраст (Kabuki синдром, Mowat-Wilson синдром, Osteoporosis – pseudoglioma синдром) или по-късно - на 16-17 години (LEOPARD синдром, Cardio-facio-cutaneus синдром). Достигането до окончателна генетична диагноза (ако все пак е възможно) при такива пациенти често се оказва продължителна и трудна дейност поради неспецифичен фенотип или широка диференциална диагноза между стотици редки генетични нарушения.

Важен принос на съвременни молекулярно-генетични методи (Methylation-Specific PCR, MLPA и др.) са диагностицирани и 13 пациенти (14,6% от патологията) с импринтинг нарушения. По-голямата част от доказаните са резултат от колаборация с център в чужбина, свързан с проучване на тези нарушения. Трябва да се отбележи заслугата на детските ендокринолози от Варненски експертен център по редки заболявания за много добре клинично оценените и селектирани пациенти.

Селективен метаболитен / ензимен анализ

Съмнение за заболяване от групата на Вродените грешки на обмяната е повод за провеждане на селективен метаболитен скрининг и/или ензимен анализ при 126 пациента в детска възраст. Въпреки че почти всички ВГО спадат към групата на редките или ултраредки болести, предвид големия им брой, надвишаващ 1600 според най-пълната база данни за ВГО (Inborn errors of metabolism Knowledgebase), (www.IEMbase.org), общата им честота е висока - 1/500 новородени.

Установените и потвърдени лица с ВГО в резултат на проведен селективен метаболитен /ензимен анализ при нашето проучване, са 14 от 126 изследвани (11,1%) (Табл.7). Предвид факта, че има и лечими заболявания сред тях, ранното им диагностициране е важно. Проучване на *Hooytema van Konijnenburg et al.* показва, че броят на лечимите метаболитни заболявания, които се проявяват основно със забавяне в развитието/УМИ е около 116 и се е увеличил с 1/3 за последните осем години (*Hooytema van Konijnenburg et al, 2021*). Включването на такива заболявания в *масовите* неонатални скринингови програми в различните държави има за цел навременното диагностициране и лечение. В държавите от Европа броят на изследваните ВГО варира между 0 и 30 (*Loeber et al, 2021*). В България са обхванати само 2 заболявания - фенилкетонурия и вродена надбъбречна хиперплазия, като в момента тече дебат за разширяването му чрез нова програма.

5.2.3.3. Обсъждане на резултати от работа в генетичната консултация с дисморфологични програми

При повече от половината от активно консултираните лица (520; 53,7%) за 10-годишния период е описан *лицев* дисморфизъм. Извън лабораторните подходи за етиологично изясняване в помощ на генетичния консултант се включват и база данни от специализирани програми по дисморфология. Важна първа стъпка в генетичното консултиране е детайлно събрана информация за фамилната история, личната история на детето, физикално изследване и описание на аномалиите, включително фотодокументирането им. Снимковият материал на пациентите е организиран във файлове с имената на лицата, заподозряна или потвърдена диагноза. Фотографирането е важна част от консултативния процес при пациенти с дисморфизъм (при взето съгласие на родителите). Това дава възможност за споделяне на снимките с други специалисти в страната и чужбина (в случаите на изразен дисморфизъм), с цел диагностично уточняване, както и използването на он-лайн базирани дисморфологични приложения за анализ на лицев дисморфизъм, като *Face2Gene*.

Прилагането на *Face2Gene* в нашата практика започва след 2015г. и се превръща в задължителен етап от консултирането на пациенти (не само в детска възраст) с дисморфизъм.

Освен поставяне на снимка за търсене на лицево припокриване/прилика с дисморфични състояния, приложението дава възможност за въвеждане на установените при пациента аномалии и други клинични прояви, както и антропометрични показатели. Използването на *Face2Gene* служи едновременно и като *регистър* на дисморфичните пациенти с въвеждане на имена, дата на раждане, дата на посещение, потвърдена генетична или клинична диагноза.

Въпреки, че в по-голямата част от случаите не ни насочи към конкретна диагноза, при 33,2% е потвърдена генетична или поставена клинична диагноза – това са 71 от 214 пациентски профили, използвали базата данни за периода 2016-2020г. В голямата си част - 71,8%, (51 от тези 71) диагнозата попада в първите десет програмни предложения. Успеваемостта от 71,8% на приложението при нас е по-ниска от докладваната от *Gurovich et al.*, възлизаща на 91% „*top-10 точност*“ при разкриване на над 215 различни генетични синдроми (*Gurovich et al, 2019*). По-ниската разкриваемост при нашите пациенти може да е свързана с това, че някои от установените диагнози са на редки микроструктурни нарушения или ултраредки дисморфични синдроми, за които няма достатъчно данни в приложението. Но както *Dolgin* коментира, *Face2Gene* в момента е общодостъпно приложение за здравни специалисти, които го използват за подпомагане диагностицирането на рядко срещани генетични заболявания, като едновременно с качването на пациентски снимки и информация, допълват данните и увеличават точността на приложението (*Dolgin, 2019*).

Изчислено е, че около 30-40% от редките болести се представят с лицево-черепни аномалии, което показва важната роля на дисморфолога, но в същото време според *Hurst* и нелеката задача по отношение обхват на антропоморфични познания и използван речник знания, необходими за постигане на точна диагноза (*Hurst, 2018*). Според *Gripp et al.* данните от анализа на лицеви дисморфични белези могат да допълнят обобщението на клиничния фенотип и да предоставят информация извън личния опит на консултиращия специалист/дисморфолог (*Gripp et al, 2016*). По-доброто фенотипиране при пациент с дисморфизъм позволява по-добра геномна интерпретация особено при провеждане на WES/WGS и е възможно в близко бъдеще лабораториите да започнат да изискват снимки, които да придружават писменото фенотипно описание във формулярите за заявка (*Hurst, 2018*). Важно е да се отбележи, все пак, че софтуерите за лицево разпознаване не могат да заместят ролята на дисморфолога, а по-скоро подобряват прецизността на дисморфологичния физически преглед и предоставят допълнителен диагностичен ресурс.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И НАСОКИ ЗА БЪДЕЩА РАБОТА

Кабинетът за медико-генетична консултация има съществено значение в подхода за обслужване в мултидисциплинарния диагностичен процес по разкриване генетичната етиология на болести и предразположения при пациент и неговото семейство. Това е свързано както с назначаване и интерпретиране на генетичните изследвания, така и с обхачане и консултиране на родственици с подпомагане репродуктивното поведение и генетична профилактика при тези семейства.

Генетичното консултиране и изследване на деца е една от основните дейности в ЛМГВ с установена тенденция към съществено увеличаване в годините на броя проведени МГК и/или насочени проби/пациенти за анализ. По отношение на насочващите структури за генетично обслужване на детския контингент очаквано преобладаваха Детските клиники на Университетската болница, в която е базиран медико-генетичният кабинет. Отчитаме нисък и много нисък дял на насочване съответно от детска психиатрична клиника и от общопрактикуващите лекари (0,7%), което си обясняваме основно с недостатъчната им информираност по отношение смисъла и значението на генетичната консултация и лабораторни изследвания при изясняване етиологията на генетичните заболявания. Най-честото *клинично показание* за насочване (предимно за цитогенетичен анализ) за всички регистрирани беше условно обособената група „вероятна хромозомна болест с или без нарушения в половото развитие“, включваща и подгрупата „отклонения в растежа без съпътстващи симптоми“.

Обособяването на селектирана група пациенти с предимно неясна/непотвърдена диагноза, насочени за МГК, имаше за цел да се разграничи от предимно лабораторната дейност (в много от случаите без директен контакт с пациент/семейство). Водещо показание при тези пациенти (почти 50%) беше съмнение за неясен дисморфичен синдром/МВА със или без УМИ, свързани и с най-големи диагностични трудности.

От проведените лабораторни генетични/метаболитни изследвания, най-голям беше дялът на ЦГА на лимфоцитни култури, разкрил патология при 13,6% от всички изследвани, с преобладаване на автозомната бройна патология (53,0%), докато в групата на активно консултираните - разкритата патология беше 7,5%, предимно автозомни структурни нарушения. При лица с неясна диагноза и МВА със или без нарушение в НПР микрочиповият анализ показва висок процент разкриваемост (24,2%). Въпреки, че се касаеше за малък брой изследвани пациенти, с приложени преди това един или повече други анализи, този резултат затвърждава препоръките за използването му като метод на избор при тези пациенти. MLPA анализът, също намира важно приложение, главно като скринингов метод сред лица със

съмнение за разпознаваем микроделеционен /микродупликационен синдром или с неизяснено изоставане в НПР/МВА, с установена от нас разкриваемост от 9,3% от проведен скрининг. Обсъжда се и въпросът за необходимостта от популяризиране на молекулярно-генетичния скринингов подход за изследване на предимно момчета с нарушение в НПР/УМИ, дори и без наличие на други симптоми за *FRAXA* синдром.

По отношение на изследваните пациенти със съмнение за *моногенна* патология техният брой беше малък, но обобщено резултата от приложението на различни молекулярно-генетични методи допринесе за разкриване/уточняване на диагноза в 53,3% (89 от 167 изследвани). Прилагани са различни по вид молекулярно-генетични методи, в зависимост от подозираното нарушение и вида на най-честите мутации, предимно ДНК секвениране (по Sanger и NGS). Проследяването по години на провежданите молекулярно-генетични анализи показва статистически значимо петкратното увеличение в последните три години в сравнение с първите три от анализирания период, особено осезаемо за секвениране чрез NGS технологиите. Тяхното приложение предоставя възможност за значително скъсяване на диагностичния процес при пациенти с редки/ултраредки генетични болести. Нашите резултати показват висок диагностичен принос (48,1%) на NGS технологиите предимно при заподозрени (по-малко неясни) заболявания, макар и при ограничен брой изследвани лица (54).

По-голямата част от пациентите, насочени за МГК бяха с неясна или неуточнена причина за МВА/дисморфизъм/УМИ, поради което важен и често използван диагностичен ресурс в практиката на медицинските генетици бяха софтуерните онлайн-базирани програми и дисморфологични бази данни, с особен принос на общодостъпното он-лайн приложение *Face2Gene*. То спомогна за поставянето на диагноза на пациенти с редки и ултраредки синдроми. Все повече се обсъжда използването на такива софтуери за лицево разпознаване за по-доброто фенотипиране при пациент с дисморфизъм, което ще позволи и по-добра геномна интерпретация особено при провеждане на WES/WGS.

За целите на подобряване подхода за провеждане на клинично – генетична оценка на наследствено заболяване е необходимо:

- По-насоченото информирание и обучение на психиатри, общопрактикуващи лекари, специалисти педиатри от доболнична помощ за показания за насочване, възможностите и ограниченията на генетичните изследвания и ползата на ГК както за индексния пациент, така и за семейството като цяло.

- Необходими са усилия в посока разширяване приложението и финансовото обезпечаване на съвременни генетични методи на изследване при пациенти в детска възраст със съмнение за генетично заболяване – *микрочипов анализ, MLPA* скрининг за чести микроделеционни/ микродупликационни синдроми и субтеломерни микроаберации, *скрининг за FRAXA, NGS*.

- Отчетеният нисък дял на насочени пациенти за МГК с единични вродени аномалии – налага по-активното им търсене и проследяване, както и създаване на *регистър за ВА за Варна и региона*

- Да се подпомогне и участва в създаването на национални регистри за редки генетични болести

- С цел по-лесен достъп на пациенти от отдалечени региони до високо-специализираната генетично-консултативна дейност е необходимо въвеждане в рутинната практика на генетично-консултативния център на телегенетиката (генетично консултиране от разстояние чрез видеоконферентна връзка)

- Подобряване и разширяване на контакти и колаборации с екипи във и извън страната. Важна цел ще бъде активното използване на Европейските референтни мрежи (ERN), което ще предложи по-добри възможности и достъп за пациентите с редки болести до експерти, за да получат точна диагноза и съвет за най-доброто лечение и управление на състоянието им.

7. ИЗВОДИ

1. По отношение на **дескриптивно-епидемиологичните** данни и **показания** може да се направи извод, че:

- Детският контингент съставлява почти *половината* (46,3%) от всички лица, регистрирани в генетичната структура; тенденцията е към съществено увеличаване. Преобладаваща е *най-ранната* възрастова група (0-6 г). Една трета (31,0%) са пациенти с неясно / недоказано клинично нарушение налагащо активен диагностичен подход (лабораторен и консултативен) за поставяне на клинична и/или генетична диагноза.
- Голямото болшинство пациенти са *насочени* от две от специализираните педиатрични клиники. Недостатъчната обръщаемост от други клиники, доболничните специалисти по Педиатрия и по Обща медицина е признак за неосъзната значимост и оценяване обекта на генетичната грижа - семейството, а не (само) индексния пациент.
- Най-честото *клинично показание* за насочване е „Вероятна хромозомна болест с или без нарушения в половото развитие“. В последните години то е заменено от „Отклонения в растежа без съпътстващи симптоми“ мотивирано от консесус за съвременни насоки за начално изследване. Водещо показание при пациенти, нуждаещи се от *активна* диагностична дейност е единична или множествени ВА / със или без УмИ, което отразява огромната генетична хетерогенност и трудностите при поставяне на синдромна генетична диагностика.

2. Обобщението и анализът на генетични изследвания за оценка **диагностичния лабораторен** принос в изясняване етиологията на наследствените нарушения при деца показва, че:

- *Конвенционален цитогенетичен анализ* е водещо изследване (64,9%), с тенденция към намаляване на фона на навлизащите високо-резолютивни генетични методи за анализ. Разкриваемостта е адекватна и статистически значима при суспекция за хромозомна болест, но незначителна при пациенти с нарушение в НПР/аутистичния спектър или нарушение в растежа, което налага прецизиране на клиничното показание с директно насочване към други генетични методи на изследване.
- При *селективен скрининг чрез ДНК анализ* за известни моногенни болести, наследствени предразположения и фармакогенетични дефекти: най-голям дял и диагностична разкриваемост се открива при лица със съмнение за муковисцидоза; недостатъчна обръщаемост се отчита при съмнение за бета-таласемия, което рефлектира върху фамилия характер в генетичното обслужване. Големият дял

разкрити лица с висок риск за целиакия и синдром на Gilbert затвърждава значението на генетичното изследване за профилактично поведение на пациенти и фамилно обхващане.

- *Молекулярно-генетични методи* се прилагат по индикации както следва при пациенти:
 - ✓ с неясно изоставане в НПП/УМИ с дисморфизъм водещо е приложението на *микрочиповия анализ*, което налага той да се прилага като метод на първи избор, следван от *MLPA скрининг* за чести микро-делеционни/ дупликационни синдроми и субтеломерни микроабрации
 - ✓ с изоставане в НПП/ASD (предимно от мъжки пол), без дисморфичен фенотип е показан *скрининг за FRAXA*
 - ✓ със съмнение за моногенно заболяване, с акцент върху неврологичната/невромускулна симптоматика от значение е приложението на *ДНК секвениране* (предимно *диагностични панели за екзомно секвениране*)
 - ✓ с неясна клинична диагноза приложението на *цялоекзомно (WES)* или *клинично екзомно (CES)* секвениране заема водещо място.
- *Селективен метаболитен скрининг /ензимен анализ* спомага за диагностицирането на 11,1% от изследваните със съмнение за метаболитна болест лица, което е резултатен селективен подход в пациенти от най-ранна възрастова група, при силно редуциран панел за масов генетичен скрининг на новородени за ВГО.

3. **Цялостната оценка** от десетгодишната дейност на медико-генетичната консултация в мултидисциплинарния диагностичен процес на разкриване генетичната етиология на болести и предразположения при пациенти в детска възраст възлиза на **22,3%** с предимство на *лабораторно* (генетично и метаболитно) доказана причина за заболяването - 17,2% пациенти над 5,1 % с *клинична* диагноза (генетична болест/синдром или единична вродена аномалия). Най-голям дял от разкритата патология съставляват хромозомните болести, (37,1%), следвани от моногенните болести (19,7%) и предразположения (19,3%).
4. **Активната генетико-диагностична дейност** (лабораторна и консултативна) има основен *принос* при 34,2% от селектираната група (10,6 % от всички обхванати) за изграждане на генетичната и/или клинична диагноза при неясно / недоказано клинично нарушение. Най-голям дял разкриваемост заемат пациенти със съмнение за *моногенна (неметаболитна) болест*, а най-малък - при лица с изоставане в НПП. Водещи са отново *лабораторно-*поставените диагнози. Ролята на специалиста в МГК е свързана не само за насочване и интерпретиране на лабораторните резултати, но и диагностиката на редки дисморфични

синдроми чрез използване на софтуерни онлайн-базирани програми и дисморфологични бази данни приложения.

5. Насоките за подобряване подхода за провеждане на клинично - генетична оценка на наследствено заболяване в цялостната мултидисциплинарна грижа към пациента са свързани с извеждане на осъзната необходимост от:
- Повишаване активността, доверието и обръщаемостта към генетичните звена преди всичко от доболничната мрежа специалисти по Педиатрия, Психиатрия и Обща медицина чрез подобряване информираността им за показания за насочване, значение на етиологично изясняване на диагнозата при индексния пациент и обхващане на неговите родственици с репродуктивен риск в генетичната консултация.
 - Разширяване панела от лабораторни възможности при предполагаеми клинични диагнози чрез приложение на съвременни високо-резолютивни генетични методи по показание на генетичния консултант и панела за метаболитни нарушения в Програмата за скрининг за ВГО при новородени. Тяхното приложение подобрява лабораторните диагностични възможности, въпреки финансовите, в някои случаи аналитични ограничения за рутинно прилаган подход.
 - Важната роля на генетичния консултант е свързана и със съкращаване на диагностичното търсене при пациенти с редки и ултраредки дисморфични синдроми. Това позволява адекватна МГК при бъдещи репродуктивни планове на семейството (и близки родственици) и обсъждане на възможностите за превантивен медицински подход.

8. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

С оригинален характер

- За първи път в нашата страна се извършва и представя систематизирана научно-практическа разработка за дескриптивно-епидемиологична характеристика и оценка приноса от цялостната дейност на генетична структура в обслужване на педиатричен контингент пациенти за продължителен период от време.
- Настоящата работа е единственото публикувано изследване у нас за оценка на активната медико-генетична дейност (лабораторна и консултативна) за изграждане на генетичната и/или клинична диагноза на неясно / недоказано клинично нарушение при пациенти, и конкретно в детска възраст. Получените резултати са база за сравнителни популационни проучвания и планирани действия в областта на медицинското обслужване при пациенти със съмнение за генетично нарушение в различни епидемиологични проучвания на национално и международно ниво.
- Настоящата работа е едно от малкото проучвания у нас, което позволява на база диагностична разкриваемост на генетичните лабораторни методи и инструменти за консултативна практика да се направи сравнение и изведат най-ефективни показания за насочване при търсене на генетичната етиологична диагноза.

С потвърдителен характер

- Потвърдена е водещата роля на лабораторната диагностика за етиологично уточняване при съмнение за генетична болест/нарушение като ефективен метод за разкриване на хромозомна патология при пренатална диагностична процедура.
- Потвърдена е необходимостта от надграждане приложението на конвенционална цитогенетика със съвременни високо-резолютивни молекулярно-генетични методи за диагностика, свързано с финансова и логистична подкрепа на университетските структури.
- Потвърдено е значението на клиничното фенотипиране и селектиране на пациентите в специализираните педиатрични клиники, кабинети за генетично консултиране и експертни центрове по редки болести като условие за диагностична успеваемост.

С приложен характер

- Оптимизирани са методи за молекулярно-генетичен анализ (MLPA, молекулярно-генетичен скрининг за FRAXA, Real-time-PCR) и са усвоени компютърни програми с дисморфични база данни и приложения в рамките на Лабораторията по медицинска генетика Варна за обслужване на пациенти от обширен регион, нуждаещи се от генетична помощ.
- Изведени са насоки за подобряване информираността и подхода за провеждане на клинично - генетична оценка на наследствено заболяване за изясняване чрез лабораторни изследвания по показание (секвениране от нова генерация, микрочипов анализ, и т.н.) и компютърни дисморфични програми при обслужване на пациенти в Медико-генетичната консултация.

9. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Научни публикации в ПЪЛЕН ТЕКСТ:

1. **Стоянова М.**, М. Цветкова, М. Левкова, В. Митева, Д. Яхя, В. Йотова, М. Георгиева, Л. Ангелова. Цитогенетични изследвания при деца – опитът на Лаборатория по медицинска генетика - Варна за период от 10 години. *Педиатрия*, 2021, том 63, брой 1, стр. 31-34.
2. **Stoyanova M**, Hachmeriyan M, Levkova M, Bichev S, Georgieva M, Mladenov V, Angelova L. Molecular screening for fragile X syndrome in children with unexplained intellectual disability and/or autistic behaviour. *Folia Medica*. 2022 Feb 28;64(1):27-32.
3. **Стоянова М.**, Л. Ангелова, М. Левкова, М. Георгиева, В. Йотова. Практически аспекти и ефективност на генетичното консултиране при деца с наследствена патология. *Обща медицина*. XXIV, бр.1, 2022, 30-36.

Научни съобщения от участия, в РЕЗЮМЕ:

1. **Stoyanova M.**, L.Angelova, M.Hachmeriyan, M. Levkova, V.Miteva. Single - gene pathology in pediatric patients referred for genetic counseling for a period of five years; European Human Genetics Virtual Conference, ESHG 2020.2 - Live in Your Living Room, June 6–9, 2020; Abstracts from the 53rd European Society of Human Genetics (ESHG) Conference: Interactive e-Posters. *European Journal of Human Genetics* 28, 141–797 (2020). <http://doi.org/10.1038/s41431-020-00739-z> (IF 3.657)
2. **Milena Stoyanova**, Mari Hachmeriyan, Maria levkova, Valentina Miteva, Stoyan Bichev, Miglena, Georieva, Violeta Iotova, Lyudmila Angelova. Molecular screening for Fragile X among children with unexplained intellectual disability and/or autistic behavior. Online sessions of the Jubilee 30-th Annual Assembly of IMAB, Section: Medicine, 19 October 2020, *Abstract book*, p.24
3. **Стоянова М.**, Л.Ангелова, М.Хачмерян, М.Левкова, В.Митева. Деца с множествени вродени аномалии – диагностично предизвикателство за специалиста генетик. *Сборник с презентации* от Десета Национална Конференция за Редки Болести и Лекарства Сираци. Supplement, 2, 2019, 14, ISSN 1314-3581.

БЛАГОДАРНОСТИ

Във връзка с разработването на настоящия дисертационен труд изказвам сърдечни благодарности:

- на научния си ръководител проф. д-р Людмила Ангелова – за разбирането, търпението и вярата в мен, ценните съвети и помощта при написването на дисертацията, както и силната подкрепа в трудните за мен моменти;
- на всички колеги от Катедрата и Лабораторията по медицинска генетика, без чийто принос този дисертационен труд нямаше да бъде осъществен и по-специално на д-р Мари Хачмериян, д-р Мария Левкова и биолог Светлана Койнова за оказаната помощ и съдействие;
- на педиатрите от Детските клиники на УМБАЛ „Света Марина“ и на колегите от други генетични лаборатории и структури за добрата колаборация и съдействие;
- на пациентите и техните семейства, за съдействието в диагностичната дейност;
- на семейството ми и най-вече на съпруга ми – за търпението, подкрепата и обичта.